

2015

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

MAGISTRSKO DELO

MAGISTRSKO DELO

IZOLACIJA IN OPIS BAKTERIJ *Propionibacterium acnes*
IN *Staphylococcus epidermidis*, TER SPECIFIČNIH
BAKTERIOFAGOV IZ KOŽE IN AKEN

MAJA ŠTOKELJ

MAJA ŠTOKELJ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Magistrsko delo

Izolacija in opis bakterij *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*, ter specifičnih bakteriofagov iz kože in aken

(Isolation and characterization of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria and specific bacteriophages on skin and acne)

Ime in priimek: Maja Štokelj

Študijski program: Varstvo narave, 2. stopnja

Mentorica: doc. dr. Irena Maček

Delovni somentor: dr. Matjaž Peterka

Koper, december 2015

Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Maja ŠTOKELJ

Naslov magistrskega dela: Izolacija in opis bakterij *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*, ter specifičnih bakteriofagov iz kože in aken

Kraj: Koper

Leto: 2015

Število listov: 72

Število slik: 14

Število preglednic: 13

Število prilog: 8

Št. strani prilog: 8

Število referenc: 56

Mentorica: doc. dr. Irena Maček

Delovni somentor: dr. Matjaž Peterka

UDK: 578.347:616.5(043.2)

Ključne besede: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, bakteriofag, akne

Izvleček: Namen naloge je bil pridobiti vzorce kože in aken ter izolirati in opisati bakterije *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*, ter bakteriofage, specifične za ti bakterijski vrsti. V prvem delu so predstavljeni rezultati ustreznosti gojišč, uporabljenih za izolacijo bakterij iz vzorcev. V drugem delu sledi identifikacija izoliranih sevov, kjer smo izolirali DNK in pomnoževali gen za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo, očiščene pomnožke sevov pa smo nato poslali na ugotavljanje nukleotidnega zaporedja. S pridobljenimi sekvencami smo izrisali filogenetska drevesa. Identificirane seve smo barvali po Gramu, izrisali rastno krivuljo in določevali občutljivost na antibiotike. Tretji del je namenjen prikazu rezultatov izolacije, čiščenja, določevanja titra bakteriofagov. Sledijo jim rezultati morfološke karakterizacije, ter nabor gostitelja. Ugotovili smo, da je za izolacijo potrebno izbrati ustrezno vzorčenje in gojišča. Skupno smo izolirali 14 bakterijskih vrst iz vzorcev kože in aken. Vsi ciljni sevi so bili Gram pozitivni. *P. acnes* raste veliko počasneje kot *S. epidermidis*. Obe vrsti sta pokazali odpornost na klindamicin in tetraciklin ter občutljivost na doksiciklin. Izolirali in očistili smo 23 bakteriofagov *P. acnes* in en bakteriofag *S. epidermidis*, vse smo uvrstili v družino *Siphoviridae*. Cilj naloge je bil vzpostaviti metodologijo za vzorčenje, izolacijo in karakterizacijo bakterij in bakteriofagov, kar nam je uspelo, hkrati pa smo ugotovili kje bi bila potrebna dodatna pozornost za boljšo interpretacijo rezultatov.

Key words documentation

Name and SURNAME: Maja ŠTOKELJ

Title of master thesis: Isolation and characterization of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria and specific bacteriophages on skin and acne

Place: Koper

Year: 2015

Number of pages: 72 Number of figures: 14 Number of tables: 13

Number of appendix: 8 Number of appendix pages: 8

Number of references: 56

Mentor: Assist. Prof. Irena Maček, PhD

Working Co-mentor: Matjaž Peterka, PhD

UDK: 578.347:616.5(043.2)

Keywords: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, bacteriophage, acne

Abstract: The aim of the master thesis was to gain skin and acne samples to isolate and characterize *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* bacteria and specific bacteriophages. In the first part of the results, the suitability of the chosen culture medium is presented. The second part consists of the identification of bacteria with DNA isolation, amplification of the 16S rRNA with polymerase chain reaction and purification of the amplicons that were sent for assessment of the nucleotide sequence. The phylogenetic tree was constructed. The identified strains were Gram stained, we draw a growth curve and analyzed the antibiotic susceptibility. The third part was focused on the results of isolation, cleaning and titer determination of the bacteriophages. We also morphologically characterized them and determined the host range. We noted that it is important to choose the proper sampling method and medium for isolation. We identified 14 species of bacteria from skin and acne samples. All the target strains were Gram positive. *P. acnes* grew much slower than *S. epidermidis*. Both species were resistant to clindamicin and tetracycline, and sensitive to doxycycline. We isolated 23 *P. acnes* and one *S. epidermidis* bacteriophage, all from *Siphoviridae* family. The goal of the thesis was to establish the methodology for sampling, isolation and characterization of bacteria and bacteriophages which was achieved, in addition we have identified steps where extra attention is needed for better interpretation of the results.

Kazalo vsebine

1 UVOD.....	1
1.1 MIKROBNA ZDRUŽBA KOŽE	2
1.2 AKNE KOT BOLEZEN KOŽE	4
1.3 POVZROČITELJI AKEN	5
1.3.1 <i>Propionibacterium acnes</i>	5
1.3.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	6
1.3.3 Zdravljenje aken z antibiotiki	7
1.4 BAKTERIOFAGI.....	8
1.4.1 Biologija bakteriofagov	8
1.4.2 Potencial bakteriofagov kot nov način zdravljenja.....	10
1.4.3 Bakteriofagi <i>Propionibacterium acnes</i> in <i>Staphylococcus epidermidis</i>	11
1.4.3.1 Bakteriofagi <i>Propionibacterium acnes</i>	11
1.4.3.2 Bakteriofagi <i>Staphylococcus epidermidis</i>	12
2 MATERIALI IN METODE	14
2.1 MATERIALI.....	14
2.1.1 Bakterijski sevi	14
2.1.2 Gojišča in pufri	14
2.1.3 Pufri, reagenti, delovni kompleti ter druge kemikalije pri delu z bakterijami, bakteriofagi in DNA	15
2.1.4 Seznam laboratorijskih pripomočkov	16
2.1.5 Seznam laboratorijske opreme	16
2.2 METODE DELA	17
2.2.1 Vzorčenje	17
2.2.2 Izolacija bakterij iz vzorcev	19
2.2.3 Določanje identitete izoliranih sevov	19
2.2.3.1 Izolacija DNK	20
2.2.3.2 Pomnoževanje gena za 16S rRNK z verižno polimerazo	20
2.2.3.3 Ugotavljanje vrste bakterij in izris filogenetskega drevesa.....	21

2.2.3.4 Rastna krivulja.....	21
2.2.3.5 Občutljivost bakterij na antibiotike	22
2.2.4 Izolacija, čiščenje in namnoževanje bakteriofagov	23
2.2.4.1 Priprava plošč s konfluentno rastjo bakterij za delo z bakteriofagi.	23
2.2.4.2 Izolacija bakteriofagov	24
2.2.4.3 Čiščenje bakteriofagov	25
2.2.4.4 Določevanje titra in shranjevanje	26
2.2.5 Morfološka karakterizacija bakteriofagov, ter nabor gostitelja	26
2.2.5.1 Velikost in oblika plakov	26
2.2.5.2 Presevna elektronska mikroskopija.....	26
2.2.5.3 Nabor gostitelja	27
3 REZULTATI	28
3.1 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VZORCEV	28
3.1.1 Selektivna gojišča	28
3.2 DOLOČANJE IDENTITETE IZOLIRANIH SEVOV	29
3.2.1 Izolacija DNK in pomnoževanje gena za 16S rRNK z verižno polimerazo.....	29
3.2.2 Identifikacija in izris filogenetskega drevesa.....	30
3.2.2.1 Identificirani sevi <i>P. acnes</i> in <i>S. epidermidis</i>	30
3.2.2.2 Filogenetsko drevo	30
3.2.3 Barvanje po Gramu	32
3.2.4 Rastna krivulja	32
3.2.4.1 Rastna krivulja <i>P. acnes</i>	32
3.2.4.2 Rastna krivulja <i>S. epidermidis</i>	33
3.2.5 Občutljivost na antibiotike.....	34
3.2.5.1 Občutljivost sevov <i>P. acnes</i> na izbrane antibiotike	34
3.2.5.2 Občutljivost sevov <i>S. epidermidis</i> na izbrane antibiotike	34
3.3 BAKTERIOFAGI.....	36
3.3.1 Izolacija bakteriofagov	36
3.3.2 Čiščenje in ugotavljanje števila bakteriofagov	37

3.3.3. Morfološka karakterizacija bakteriofagov ter nabor gostitelja	37
3.3.3.1 Velikost in oblika plakov	37
3.3.3.2 Presevna elektronska mikroskopija	38
3.3.3.3 Nabor gostitelja	39
4 DISKUSIJA	41
4.1 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VZORCEV IN IZBIRA SELEKTIVNIH GOJIŠČ	41
4.2 DOLOČANJE IDENTITETE IZOLIRANIH SEVOV	42
4.2.1 Identifikacija, izris filogenetskega drevesa in barvanje po Gramu	42
4.2.2 Rastna krivulja	43
4.2.3 Občutljivost na antibiotike	44
4.3 BAKTERIOFAGI	45
4.3.1 Izolacija bakteriofagov	45
4.3.2 Čiščenje in ugotavljanje števila bakteriofagov	46
4.3.3 Morfološka karakterizacija bakteriofagov	46
4.3.3.1 Presevna elektronska mikroskopija	46
4.3.3.2 Nabor gostitelja	47
5 SKLEP	48
6 LITERATURA	49

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Seznam pridobljenih bakterijskih sevov	14
Preglednica 2: Reakcijska mešanica za PCR.....	20
Preglednica 3: PCR program	20
Preglednica 4: Koncentracije antibiotikov in velikost premera za ugotavljanje občutljivosti bakterij na antibiotike.	23
Preglednica 5: Barvanje po Gramu za identificirane seve <i>P. acnes</i>	32
Preglednica 6: Barvanje po Gramu za identificirane seve <i>S. epidermidis</i>	32
Preglednica 7: Občutljivost identificiranih sevov <i>P. acnes</i> na izbrane antibiotike (CLI-klindamicin, TET-tetraciklin, DOX-doksiciklin in CEP-cefalotin). Vrednosti v krepkem tisku označujejo odpornost, poševni tisk pa občutljivost.	34
Preglednica 8: Občutljivost identificiranih sevov <i>S. epidermidis</i> na antibiotike (CLI-klindamicin, TET-tetraciklin, DOX-doksiciklin in CEP-cefalotin). Vrednosti v krepkem tisku označujejo odpornost, poševni tisk pa občutljivost.	35
Preglednica 9: Izolacija bakteriofagov z metodo točk oz. nakapljanja. Oznaka + ponazarja kje je vzorec liziral bakterijsko travico enega izmed 6 sevov <i>P. acnes</i> , oznaka - pa območje brez lize.....	36
Preglednica 10: Morfološka karakterizacija plakov (majhen < 1 mm, srednje velik 1 < 2 mm in velik > 2 mm), poimenovanju bakteriofagov, vzorca iz katerih so bili izolirani in bakterijah.	38
Preglednica 11: Morfološke karakterizacije izbranih bakteriofagov <i>P. acnes</i> in <i>S. epidermidis</i>	39
Preglednica 12: Nabor gostitelja na identificiranih sevih <i>P. acnes</i> z očiščenimi bakteriofagi. Intenzivnost lize smo ocenjevali z vrednostmi med 0 in 4, pri čemer je vrednost 0 pomenila, da bakteriofag sev ni liziral, 1 pojavili so se posamezni plaki, 2 veliko število še razvidnih plakov, 3 moten plak in 4 popolna liza.....	40
Preglednica 13: Nabor gostitelja na identificiranih sevih <i>S. epidermidis</i> z očiščenim bakteriofagom fSeS3. Intenzivnost lize smo ocenjevali z vrednostmi med 0 in 4, pri čemer je vrednost 0 pomenila, da bakteriofag sev ni liziral, 1 pojavili so se posamezni plaki, 2 veliko število še razvidnih plakov, 3 moten plak in 4 popolna liza.....	40

Kazalo slik

Slika 1: Shematski prikaz histologije kože in mikrobov (Grice in sod. 2011).....	2
Slika 2: Tipični bakteriofag (William in sod. 2007).....	9
Slika 3: Sistem vzorčenja z vatirano paličico na obrazu (Pa_F in Se_F) in hrbtu (Se_B in Pa_B).....	18
Slika 4: Poizkus delovanja furazolidona na rast izoliranih sevov <i>S. epidermidis</i> pri koncentracijah a) 2 µg/ml in b) 6 µg/ml (Foto: M. Štokelj).....	28
Slika 5: Rast bakterij na trdem gojišču a) BHI za izolacijo <i>P. acnes</i> iz vzorca aken in (b) MSA za izolacijo <i>S. epidermidis</i> iz vzorcev trakov za čiščenje kože (Foto: M. Štokelj)....	29
Slika 6: Posnetek gela agarozne gelske elektroforeze s PCR pomnožki bakterij <i>S. epidermidis</i> . Oznaka GR označuje dolžinski standard, vse ostale oznake nad progami, pa imena izolatov.....	30
Slika 7: Filogenetsko drevo rodu <i>Propionibacterium</i>	31
Slika 8: Filogenetsko drevo rodu <i>Staphylococcus</i>	31
Slika 9: Rastna krivulja in primerjava vrednosti parametrov optične gostote (OD ₆₀₀) in logaritmiranih vrednosti števila kolonijskih enot (logN (CFU/ml)) med tipskim (NCTC/737) in izoliranim sevom (2c/430) <i>P. acnes</i>	33
Slika 10: Rastna krivulja in primerjava vrednosti parametrov optične gostote (OD ₆₀₀) in logaritmiranih vrednosti števila kolonijskih enot (logN (CFU/ml)) med tipskim (NCTC/13360) in izoliranim sevom (SeV1) <i>S. epidermidis</i>	33
Slika 11: Primer poskusa metode diskov za test občutljivosti na antibiotike. Slika 11a) bakterijska travica <i>P. acnes</i> seva PaA1; Slika 11b) bakterijska travica <i>S. epidermidis</i> seva SeV1. Antibiotiki so označeni z naslednjimi številkami; 1-klindamicin, 2-eritromicin, 3-tetraciklin, 4- doksiciklin, 5-amoksicilin, 6-cefalotin in 7- negativna kontrola (Foto: M. Štokelj).	35
Slika 12: Primer metode nakapljanja na bakterijski travici tipskega seva <i>P. acnes</i> NCTC/737 s tremi vzorci, redčeni od 0 do 10 ⁻⁵ (Foto: M. Štokelj).	37
Slika 13: Mikroskopski preparati izbranih bakteriofagov <i>P. acnes</i> : fPaS1 izoliran iz vzorca pridobljenega s pomočjo traka za čiščenje kože, fPaA3m izoliran iz vzorca aken, fPaF6 izoliran iz vzorca brisa obraza in fPaK5 izoliran iz vzorca aken pri kozmetičarki.	39
Slika 14: Mikroskopski preparat bakteriofaga <i>S. epidermidis</i> fSeS3	39

Kazalo prilog

PRILOGA A: Identificirani sevi bakterij *Propionibacterium*

PRILOGA B: Identificirani sevi bakterij *Staphylococcus*

PRILOGA C: Ostali identificirani sevi

PRILOGA D: Fotografije identificiranih sevov *P. acnes* oz. preparatov z metodo barvanja po Gramu

PRILOGA E: Fotografije identificiranih sevov *S. epidermidis* oz. preparatov z metodo barvanja po Gramu

PRILOGA F: Fotografije identificiranih sevov ostalih bakterij oz. preparatov z metodo barvanja po Gramu

PRILOGA G: Vrednosti merjenj OD_{600} in logaritmiranih vrednosti koncentracije CFU/ml za izoliran sev in klinični sev.

PRILOGA H: Določevanje titra

Seznam kratic

angl.	angleško
BHI	možgansko srčni infuzijski bujon (angl. Brain heart infusion)
BLAST	orodje za lokalno poravnavanje zaporedij (angl. Basic Local Alignment Search Tool)
bp	bazni par
CFU/ml	število kolonijskih enot na mililiter (angl. Colony Forming Unit)
DNK	deoksiribonukleinska kislina (angl. Deoxyribo Nucleic Acid)
ds	dvoverižna
dNTP	mešanica deoksinukleotidtrifosfatov
ICTV	mednarodni komite taksonomije virusov (angl. The international Committee on the Taxonomy of Viruses)
IMI	Inštitut za Mikrobiologijo in imunologijo
lat.	latinsko
MSA	manitol solni agar (angl. Mannitol Salt Agar)
MEGA	program za analizo molekularne evolucijske genetike (angl. Molecular Evolutionary Genetics Analysis)
MRSE	na meticilin odporni <i>Staphylococcus epidermidis</i> (angl. Methicillin Resistant Staphylococcus epidermidis)
NCTC	Nacionalna zbirka tipskih sevov (angl. National Collection of Type Cultures)
NIB	Nacionalnem inštitutu za biologijo
OD₆₀₀	optične gostote pri 600 nm
PFU/ml	število plakov na mililiter (angl. phage forming units/ml)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
RNK	ribonukleinska kislina (angl. Ribo Nucleic Acid)
rpm	število obratov na minuto (angl. raund per minute)
ss	enoverižna
SAPHO	kompleksno vnetje, ki zajame kožo, kosti in sklepe (angl. Synovitis Acne Pustulosis Hyperostosis Osteitis)
SM	solno magnezijev pufer
TBE	tris/borova kislina/EDTA puferna raztopina
TEM	presevna elektronska mikroskopija (angl. Transmission Electron Microscopy)
TSB	tripton soja bujon (angl. Trypton Soya Broth)
UP dH₂O	očiščena, deionizirana in destilirana voda
% GC	odstotek baz, ki ga predstavljajo gvanini in citozini

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Ireni Maček za nasvete in strokovno pomoč pri pisanju magistrskega dela.

Center odličnosti za biosenzoriko, instrumentacijo in procesno kontrolo (COBIK, Ajdovščina) je omogočil izdelavo magistrskega dela, zato gre posebna zahvala direktorju in delovnemu somentorju dr. Matjažu Peterki. Hvala za vso pomoč, nasvete, podporo in potrpljenje.

Zahvaljujem se tudi dr. Nikolaji Janež in Evi Zaletel za nasvete in pomoč pri raziskovalnem delu ter celotni ekipi podjetja COBIK, ki so me lepo sprejeli in me vpeljali v nov svet raziskovanja.

Posebna zahvala gre staršem za vso podporo in ljubezen tekom celotnega študija. Hvala ker sta postavljala meje in mere in mi vedno znova odpuščala, ker sta me učila poslušati svoje srce in ljubiti ter rasti za jutri.

Zahvaljujem se možu za vso ljubezen in podporo tekom študija. Hvala ker si bil ob meni, mi prisluhnil, me spodbujal ter motiviral.

Hvala vsem prijateljem, ki sem jih pridobila na celotni poti.

1 UVOD

Človeško telo je med vsakodnevno aktivnostjo izpostavljeno mikroorganizmom v okolju. Koža predstavlja kritični mejnik med človeškim telesom in zunanjim okoljem, hkrati pa je tudi ekosistem, ki daje zatočišče mikrobnim združbam oz. predstavlja habitat za tranzitne ali rezidenčne populacije, med katere spadajo tudi naslednji rodovi organizmov: *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Pityrosporum*, *Propionibacterium* in *Micrococcus* (Madigan in Martinko 2006).

Nekaterim vrstam iz bakterijskih rodov *Propionibacterium* in *Staphylococcus* pripisujejo, da so povzročiteljice aken. Akne obravnavamo kot bolezen kože, pojavljanje pa je odvisno od samih fizioloških, kemičnih in genskih dejavnikov, ki se povezujejo s hormonskimi spremembami, ter tudi od prisotnosti mikroorganizmov (Aubin in sod. 2014). Med povzročiteljici aken štejejo vrsti *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*, ki sta sicer pomemben del normalne flore kože. *Propionibacterium acnes* je anaerobna, aerotolerantna bakterija, *Staphylococcus epidermidis* pa fakultativna anaerobna in aerobna bakterija, za obe pa velja, da je njuna optimalna rast pri temperaturi 37 °C. *Propionibacterium acnes* tvori paličaste ali kokalne oblike, ki se pojavljajo posamično ali v kratkih verigah, *Staphylococcus epidermidis* pa tvori kokalne oblike, ki rastejo posamično, v parih, verižicah ali skupkih (Patrick in McDowell 2009; Schleifer in Bell 2011).

Namen naloge je bil izolirati in opisati bakterije, izolirane iz vzorcev kože in aken iz rodu *Propionibacterium* in *Staphylococcus*, še posebno pa *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*, ter bakteriofage, specifične za ti bakterijski vrsti. V zadnjem desetletju namreč postaja vse bolj sprejeto dejstvo, da so bakterijski virusi ali bakteriofagi zelo razširjeni in imajo velik vpliv na biosfero. Dandanes postajajo zaradi naraščanja odpornosti bakterij na antibiotike vedno bolj zanimivi, saj predstavljajo alternativo antibiotikom pri zdravljenju bakterijskih okužb (Sabour in Griffiths 2010).

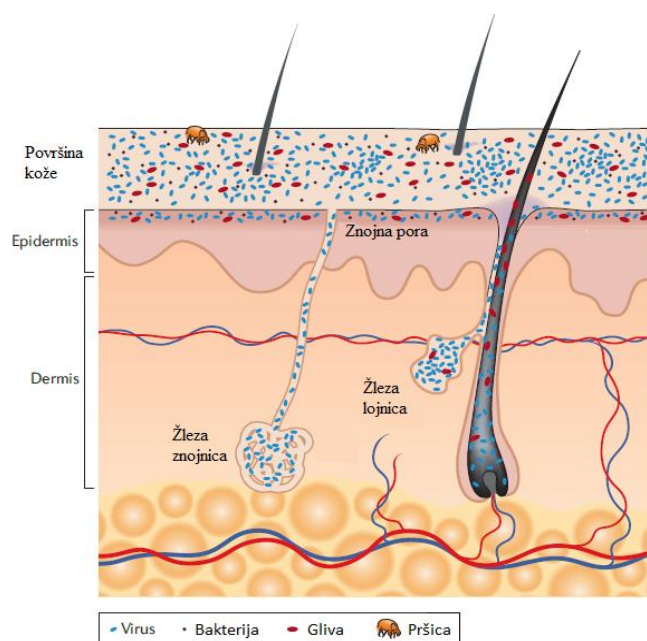
Cilj naloge je bil vzpostaviti metodologijo za odvzem vzorcev kože in aken, metodologijo za izolacijo in opis bakterij *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*, ter metodologijo za izolacijo in opis specifičnih bakteriofagov. Preverjali smo tudi odpornost omenjenih bakterij na antibiotike in litični spekter bakteriofagov bakterij *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*.

Delovne hipoteze:

1. Za uspešno izolacijo bakterijskih vrst *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis* je pomembno izbrati ustrezno selektivno gojišče.
2. Iz vzorcev kože bomo najpogosteje izolirali *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*.
3. Iz vzorcev kože bomo izolirali tudi druge vrste bakterij iz rodov *Propionibacterium* in *Staphylococcus*.
4. Pri vzorcih kože oseb z izrazitim pojavom aken je izolacija *Staphylococcus epidermidis* uspešnejša.
5. Bakteriji *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis* bosta pokazali različno občutljivost na antibiotike v odvisnosti od predhodne terapije.
6. V vzorcih kože bodo prisotni bakteriofagi bakterij *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*.

1.1 MIKROBNA ZDRUŽBA KOŽE

Koža je kritični mejnik med človeškim telesom in zunanjim okoljem, njena osnovna naloga pa je zagotavljanje pogojev za normalno izvajanje fizioloških procesov v organizmu. Koža je tudi ekosistem, ki daje zatočišče mikrobnim združbam bakterij, virusov in gliv, ki živijo v območju fizioloških in topografskih niš. Mikroorganizmi se nahajajo na površini kože, epidermisa oz. vrhnjice, ter v znojnicah, lojnicah ali lasnih mešičkih (Grice in Segre 2011; Slika 1).



Slika 1: Shematski prikaz histologije kože in mikrobov (Grice in sod. 2011)

Območja kože so v večini suha, kar predstavlja neugodno okolje za bakterijsko rast, mrtve plasti kože pa lahko tudi fizično odstranijo bakterije. Koža je hladnejša kot normalna telesna temperatura in rahlo kislila, večina bakterij pa raste najbolje pri nevtralnem pH in temperaturi 37 °C. Kot primer, vlažne pazduhe ležijo nedaleč stran od nadlakti, vendar sta ti dve niši ekološko različni kot deževni gozd in puščava (Grice in sod. 2010). Na gostitelja oz. gostoto združb lahko vpliva že sprememba temperature kože in količina vlage ob spremembi vremena. Tu imamo še vpliv starosti, saj imajo predvsem otroci bolj raznoliko mikrofloro in prenašajo več potencialnih patogenih gram negativnih bakterij, kot odrasli. Gram-negativna bakterije, kot je npr. *Acinetobacter*, v večini predstavljajo le majhen delež normalne flore, ker ne morejo tekmovati z Gram pozitivnimi bakterijami, ki so bolj prilagojene suhim razmeram kože. Slednje povečajo svojo število ob odsotnosti imunske odpornosti ali normalne kožne flore, kar izkoristijo tudi plesni kot so *Candida* spp. (Chiller in sod. 2001). Gostiteljeva obramba je sestavljena iz molekul kot so antimikrobni peptidi, proteaze, lizocimi, citokini in kemokini, ki služijo kot aktivatorji celičnega in prilagodljivega imunskega odgovora. Veliko pa na združbe vpliva tudi osebna higiena, saj imajo posamezniki s slabšo higieno običajno na koži večje mikrobne populacijske gostote (Cogen in sod. 2008).

Vloga mikrobov na koži do sedaj ni bila dobro raziskana. Študije so se namreč bolj osredotočale na razširjenost in vrste mikrobov na koži in ne toliko na razumevanje njihovega funkcioniranja in medsebojnega delovanja (Chiller in sod. 2001; Cogen in sod. 2008). To razumevanje je pomembno predvsem pri rabi antibiotikov, saj lahko nepravilna uporaba poseže v delikatno ravnovesje kožne mikroflore, kar naredi kožo dovzetno na patogene. V luči simbiotskih odnosov mikrobov in človeka lahko naletimo na mutualizem, komenzalizem (priskledništvo) in parazitizem. Koža podpira rast komenzalnim bakterijam. To pomeni, da mikrobi živijo v koeksistenci z gostiteljem, saj jim koža predstavlja ekološko nišo, sami pa lahko zaščitijo gostitelja pred patogenimi bakterijami direktno in indirektno. Direktno zaščita vključuje produkcijo bakteriocinov, produkcijo toksičnih metabolitov, indukcijo nizkega redukcijskega oksidativnega potenciala, zmanjševanje količine esencialnih hranil, preprečevanje združevanja in tekmovanja konkurenčnim bakterijam ter degradiranje toksinov. Komenzalne bakterije tekmujejo za hranila, niše in receptorje. Kot primer, *Staphylococcus epidermidis* veže keratinocitne receptorje in prepričuje povezovanje virulentni *Staphylococcus aureus*. Na drugi strani pa slednja izloča vrstno specifične antibiotične snovi, bakteriocine, ki inhibirajo rast ostalim virulentnim stafilokoknim organizmom (Cogen in sod. 2008). Indirektno lahko bakterije spodbudijo gostitelja, da poveča produkcijo protiteles, stimulirajo fagocitozo, bogatijo interferon in produkcijo citokina. Kot primer, *Propionibacterium acnes* sprošča maščobne kisline med razgradnjo lipidov, s čimer okisa kožo in prepreči rast bakteriji *Streptococcus pyogenes* (Chiller in sod. 2001).

1.2 AKNE KOT BOLEZEN KOŽE

Akne so bolezen pilosebacealne enote, ki je sestavljena iz dlake in spremljajoče lojnice. Pilosebacealne enote so razporejene po celem telesu, razen na dlaneh in podplatih, medtem ko so na obrazu, prsnem košu in vratu po devetkrat gostejše kot na drugih delih telesa (Kralj 2006).

Akne prizadenejo med 79% in 95% adolescenčne populacije. Pri ženskah in moških, starejših od 25 let, jih ima od 40 do 54% še vedno določeno stopnjo obraznih aken. Klinične obrazne akne v srednjih letih pa ostajajo z 12% pri ženskah in 3% pri moških (Cordain in sod. 2002). Čeprav akne v zdravstvu in med laiki še vedno obravnavamo le kot nujno zlo, lahko posledice aken vplivajo na psihično stanje oseb v adolescenci in na nadaljnjo kvaliteto življenja (Alharithy 2011).

Akne nastanejo zaradi naslednjih faktorjev (Kralj 2006; Alhatithi 2011; Miljoković 2013):

1. Hiperkeratinizacija oz. prekomerno poroževanje in mašenje žlez lojnic zaradi abnormalnega luščenja epitelija lojnice.
2. Androgena (dihidrotosteron) stimulirana proizvodnja sebuma oz. loja.
3. Kolonizacija *P. acnes*, ki posledično generira vnetje.
4. Individualni imunski in vnetni odgovor.

Akne se razvijejo več fazah, vsaka pa ima glede na morfologijo tudi svoje ime (Zoubolis 2004). V prvi, še ne-vnetni fazi, se zaradi motnje poroževanja lasni mešiček zapre, zaradi nabiranja loja pod njim, pa se začnejo razmnoževati bakterije. Nastane cista oz. komedonska akna (lat. *acne comedonica*), krajše komedon, ki jo delimo na odprti (nastane čepek-ogrc) in zaprti komedon (izbočena cista, brez vidnega čepka). V drugi fazi se komedon vname in nastane zatrdlina rdeče barve. To je papula (lat. *acne papulosa*). Ko je vnetje močnejše, se začne nabirati gnoj in postane rumene barve. Ta oblika se imenuje pustula (lat. *acne papulopustulosa*). Na drugi strani pa lahko vnetje poteka v globljih plasteh, kar je na površini vidno kot vozliček rdeče barve, ki mu pravimo nodus, laično podkožni mozolj. Če se začne ta gnojiti, govorimo o najhujši in najbolj boleči obliki aken o nodulocistični akni (lat. *acne nodulocystic*). V tretji fazi se proces aken umiri, vendar pusti na koži spremembe, pri hujših aknah tudi močne in globoke brazgotine.

Primernejša delitev pri terapevtskem zdravljenju je delitev na blažje, srednje in močne akne. Blažje akne zahtevajo le lokalno terapijo, srednje akne so lahko povezane z brazgotinami in poleg lokalne terapije potrebujejo tudi sistemsko terapijo, močne akne pa se zdravijo z uporabo oralnega izotretinoina (Kralj 2006).

Epidemiološke študije dokazujejo, da je obolelost z aknami nižja pri ostalih ne-vzhodnih družbah. Zaradi tega akne imenujejo kot bolezen zahodne družbe. V članku Cordain in sod. 2002 so preučevali populaciji otočanov plemena Kitavan z otoka Trobriand v Novi Gvineji in lovce Ache iz Paragvaja, ter jih primerjali z moderno družbo. Ugotovili so, da ne moremo pripisati pojavljanja aken zgolj genetiki, čeprav je izločanje sebuma genetsko kontroliran, vendar tudi okoljskim faktorjem, ter hrani in načinu življenja.

1.3 POVZROČITELJI AKEN

Bakterije, ki jih so jih najpogosteje izolirali iz pilosebacealne enote, in jih omenjajo kot povzročitelje, sta bakteriji *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* in gliva *Malassezia furfur* (Zandi in sod. 2011). Nekateri navajajo, da zdravo kožo kolonizira le *P. acnes*, medtem ko je pri osebah z močnimi aknami prisoten tudi *S. epidermidis* (Thomsen in sod. 2008). Čeprav še ni v celoti raziskan proces nastajanja aken, ne smemo izključiti ostalih mikroorganizmov, ki sodelujejo in izkoristijo vnetno stanje. Tako npr. pri procesu sodeluje tudi *Staphylococcus aureus*, ki je oportunistični patogen, saj izkoristi vnetno stanje, ki ga je pred tem povzročila *P. acnes*. Sorodnica *P. acnes*, *P. granulosum* pa naj bi se pojavila pri osebah z močno izraženimi aknami (Chiller in sod. 2001). Ker sta *P. acnes* in *S. epidermidis* največkrat omenjeni oz. prisotni pri izolaciji, smo se odločili, da ju v nadaljevanju tudi bolje opišemo.

1.3.1 *Propionibacterium acnes*

Propionibakterije (lat. *Propionibacterium*) so rod paličastih Gram pozitivnih bakterij. Poimenovane so po svojem unikatnem metabolizmu saj lahko sintetizirajo propionsko kislino. Predstavniki rodu so primarno fakultativni paraziti in komenzali na človeku in živalih, ki živijo v in okoli pilosebacelanih enot, žlezah znojnicah in ostalih delih kože. V večini ne povzročajo problemov pri človeku (Patrick in McDowell 2009).

P. acnes je anaerobna, aerotolerantna in difteroidna, Gram pozitivna bakterija. Celice so lahko kokoidne, razvejane ali filamentne z dolžino do 20 µm. Pojavijo se posamično v parih ali v kratkih verigah, v V ali Y konfiguraciji ali v skupkih. *P. acnes* lahko nekaj ur tolerira kisik, vendar je za rast in izolacijo potrebo anaerobno okolje. V anaerobnih razmerah preživi do osem mesecev *in vitro*, dolgo periodo časa pa preživi tudi v človeškem tkivu z nizkim oksidativnim potencialom (Aubin in sod. 2014). Optimalna temperatura za rast kolonij, ki so lahko bele, roza, sive, rdeče, rumene ali oranžne barve, je 37 °C. Oblika kolonij je okrogla, konkavna in svetlikajoča ali manjša, ploščata in suha (Patrick in McDowell 2009). Lahko je odporna na fagocitozo in se upre makrofagom (Aubin in sod. 2014).

Njen habitat so pilosebacealne žleze na človeški koži, najdemo pa jo tudi v ustih, v genito-urinalnem traktu, očeh in debelem črevesju. Prisotnost bakterije na koži se razlikuje od osebe do osebe in lahko doseže število večje od 10^6 bakterij/cm² (Patrick in McDowell 2009).

Na eni strani jo obravnavajo kot povzročiteljico aken, saj ji anaerobne razmere ustrezajo, hkrati pa naj bi proizvajala imunostimulantne snovi. Po drugi strani pa nekateri znanstveniki menijo, da je dominanca *P. acnes* v pilosebacealnih enotah le stranski učinek vnetja, ne pa vzrok zanj (Thomson in sod. 2008). Preiskuje se tudi možnost, da le nekateri sevi *P. acnes* povzročijo akne, medtem ko drugi sevi prebivajo le na zdravi koži (Lomholt in Kilian 2010). *P. acnes* delijo na biotipe IA₁, IA₂, IB, IC, II in III (Rollason in sod. 2013).

P. acnes so prepisovali nizko patogenost, vendar je bila v zadnjem času, poleg aken, opisana in vključena v številne klinične primere: vnetje prostate, sarkoidozo, infekcije prsnih vsadkov, kardiovaskularnih naprav, očesnih vsadkov, sklepne protetike in SAPHO (Sinovitis, Akne, Pustuloza, Hiperostoza in Osteitis), kompleksno vnetje, ki zajame kožo, kosti in sklepe. Pomemben virulentni faktor je tudi formiranje biofilma (Patrick in McDowell 2009).

1.3.2 *Staphylococcus epidermidis*

Stafilokoki (lat. *Staphylococcus*) so rod Gram pozitivnih, aerobnih ali fakultativno anaerobnih kokov. Rod stafilokokov zajema 34 različnih vrst. Nekateri izmed njih lahko povzročajo gnojna vnetja, sepse, okužbe s hrano ipd. Večina vrst za človeka je nenevarnih in so del normalne bakterijske flore na koži in sluznici, manjši delež pa se nahaja tudi v tleh (Schleifer in Bell 2011).

S. epidermidis je koagulaza negativen stafilokok, ne sporogen, Gram pozitiven. Celice so v obliki kokov velikih do 1 μm, ki se pojavljajo v parih, skupkih ali posamično. Kolonije so sive, sivo bele, gladke, dvignjene, svetlikajoče. Je fakultativni anaerob, najbolje pa raste v aerobnih razmerah. Rast je dobra pri koncentracijah NaCl do 7,5% in pri temperaturi 37 °C (Schleifer in Bell 2011).

Habitat je koža in sluzne membrane človeka in ostalih sesalcev, predvsem hišnih ljubljencev. Kolonizira predvsem pazduho, glavo in nosnice. Je najpogosteje izoliran stafilokok in bakterijska vrsta iz človeškega epitelija (Cogen in sod. 2008).

Je oportunistični patogen, ki med koagulaza negativnimi stafilokoki povzroča največje število infekcij npr. MRSE na meticilin odporni *Staphylococcus epidermidis* (angl. Methicillin Resistant *Staphylococcus epidermidis*). Formira lahko biofilm, kar dodatno oteži zdravljenje (Queck in Otto 2008). Kolonizira lahko različne medicinske pripomočke (predvsem katetre),

povzroča pooperacijske infekcije, infekcije urinalnega trakta, infekcijo ran (Schleifer in Bell 2011) pa tudi infekcije oči, ušes, nosa in grla (Queck in Otto 2008).

Na patogenost *S. epidermidis* so vplivali različni faktorji: polimorfizem v enem nukleotidu v patogeno sorodnih genih, diferencialna ekspresija genov, ki vplivajo na virulenco bakterije, pridobitev novih virulentnih faktorjev in potencial lateralnega transferja genov. Ti faktorji so vplivali na evolucijo *S. epidermidis*, da je iz komezalnega patogena prešel v bolj agresiven oportunistični patogen (Daniel in sod. 2007).

Raziskovalci Pathak in sod. (2013) so preučevali vlogo oz. vpliv *S. epidermidisa* skupaj z *P. acnes* in *S. capitis* pri procesu nastajanja aken in ugotovili, da je vnetje, ki sta ga povzročili zadnji dve, ob prisotnosti *S. epidermidisa* upočasnjeno oz. preprečeno. Prekomerno rast pri *P. acnes* prepreči zato, ker lahko fermentira glicerol v jantarno oz. sukcinso maščobne kisline (Wang in sod. 2014).

1.3.3 Zdravljenje aken z antibiotiki

Akne so počasi odzivajo na terapijo z antibiotiki; tipično ta traja več mesecev. V sedemdesetih letih raziskovalci niso poročali o propionibakterijah odpornih na antibiotike, vendar so se leta 1979 v Evropi, ZDA, Avstraliji in vzhodni Aziji pojavili prvi sevi odporni na makrolide, eritromicin in klindamicin (Ross in sod. 2003).

Akne zdravijo z antibiotiki, ki delujejo na naslednji način (Dréno in sod. 2004; Webster in sod. 2008):

1. Ciklini (tetraciklin, doksiciklin, oksitetraciklin, limecilin in minociklin) delujejo kot antibiotiki in kot protivnetno zdravilo. Antibakterijsko blokirajo 30S ribosomalno podenoto in inhibirajo translacijo med sintezo proteina. Dobro učinkujejo na zdravljenje aken, vendar se pri pacientih, ki jih ne tolerirajo uporabljajo makrolidi.
2. Makrolidi (eritromicin, klindamicin in azitromicin) se ireverzibilno vežejo na bakterijsko 50S ribosomalno podenoto s čimer inhibirajo translokacijo med sintezo proteinov. Predstavniki skupine imajo vedno bolj omejujoč vpliv pri zdravljenju, zaradi povečane odpornosti na antibiotike.
3. Ostali antibiotiki: Ciprofloksacin inhibira topoisomerase encimi, ki so odgovorni za replikacijo bakterijske DNK, translokacijo in popravila. Co-trimoksazol vpliva na bakterijsko sintezo purina in pirimidina...

Ross in sod. (2003) so pokazali, da je 50% *P. acnes* izoliranih sevov iz šestih evropskih držav (Španija, Italija, Grčija, Madžarska, Združeno kraljestvo in Švedska) odpornih na klindamicin in 20% na tetraciklin, izolati iz Španije pa so se izkazali za najbolj odporne na vsaj en

antibiotik. V študiji Zandi in sod. (2011) je bilo od 56,9 do 93,1% sevov *P. acnes* občutljivih na co-trimoksazol, klindamicin, eritromicin in tetraciklin, na doksicikin in azitromicin pa niso zaznali odpornosti. Slednji je bil do sedaj v uporabi le kratek čas, medtem ko je klindamicin v uporabi že dolgo časa. Na drugi strani sta Dhillon in Varshney (2013) v študiji iz vzorcev oseb z močnimi aknami izolirala vrste *S. aureus*, *S. epidermidis* in *P. acnes*. Ko so preverjali občutljivost na antibiotike so ugotovili, da so te vrste pokazale odpornost na eritromicin, tetraciklin in klindamicin ter občutljivost na rifamicin. Zaključili so, da je pogosta uporaba antibiotikov vodila v antimikrobno odpornost tudi pri drugih vrstah, ne samo pri *P. acnes*, skrb vzbujajoča pa je predvsem odpornost pri stafilokokih.

Pri zdravljenju aken z antibiotiki je potrebno upoštevati resnost bolezni, stroškovno učinkovitost, pozitivne strani in potencial razvoja odpornosti (Dhillon in Varshney 2013), predvsem pri uporabi, daljši od 6 mesecev (Dréno in sod. 2004).

1.4 BAKTERIOFAGI

V zadnjem desetletju postaja sprejeto dejstvo, da so bakterijski virusi ali bakteriofagi, zelo razširjeni in imajo velik vpliv na biosfero. Vplivajo na število bakterij, so vodilo za globalne geokemične cikle in so rezervoar največje genetske in proteinske raznolikosti na Zemlji (Sabour in Griffiths 2010). V okoljskih vzorcih je prisotnih kar desetkrat več bakteriofagnih delcev kot bakterijskih, same bakteriofagne populacije pa so zelo dinamične. Preučevanje bakteriofagov in njihovih genomov bo vodilo v razumevanje njihove vloge v bakterijski biologiji, evoluciji in raznovrstnosti, hkrati pa bomo bolje razumeli njihov vpliv na raznolikost, ekologijo in recikliranje organskega materiala (Daniel in sod. 2007). Študij bakteriofagov je že igral osrednjo vlogo v nekaj najpomembnejših odkritjih v bioloških znanostih, od identifikacije DNK do razvoja rekombinantne molekularne tehnologije (Kutateladze in Adamia 2010).

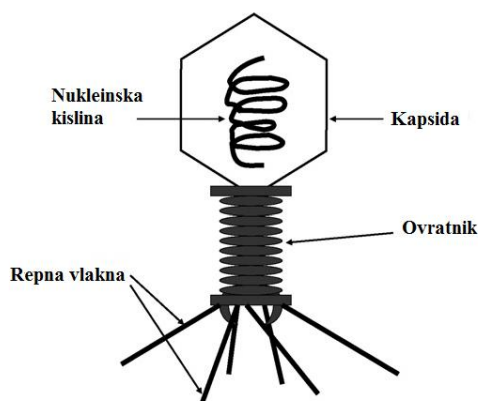
Pionirja v bakteriofagnih raziskavah sta bila Frederick W. Twort (1915) in Felix d'Herelle (1917). Slednji je tudi vpeljal besedo bakteriofag, ki je sestavljena iz besede *bacteria* in grške besede *phagein*, ki pomeni pojesti. Definiral je tudi besedo plak, s čimer je opisal območje čistine, ki jo povzroči infekcija enega bakteriofaga na dvoslojnim gojišču (Sabour in Griffiths 2010).

1.4.1 Biologija bakteriofagov

Bakteriofage lahko opišemo kot obligatorne znotrajcelične bakterijske parazite, ki jim manjka lastni, samostojni metabolizem. Bakteriofagi specifično napadejo le tarčne bakterije. Ta

specifičnost je visoko definirana in vsak bakteriofag bo napadel le eno vrsto ali, v nekaterih primerih, le en sev bakterij (Daniel in sod. 2007).

Obstaja veliko morfoloških tipov bakteriofagov, v večini pa imajo karakteristiko, ki je prikazana na Sliki 2 (William in sod. 2007). Glava je proteinski ali lipoproteinski plašč, običajno v obliki ikozaedra, ki vsebuje genom, sestavljen iz dvoverižne (ds, angl. double stranded) ali enoverižne (ss, angl. single stranded) DNK ali RNK (Sabour in Griffiths 2010). Veliko baz v fagni DNK je kemijsko modificiranih, kot zaščita pred gostiteljevo zavrtnitvijo in nukleaznimi encimi. Rep je lahko kontraktilna struktura na katero je povezanih 6 repnih vlaken z receptorji na koncih, ki prepoznajo ustrezna prijemalna območja na površini bakterije (William in sod. 2007). To so lahko proteini, oligosaharidi, teikoidna kislina, peptidoglikan ali lipopolisaharid. V nekaterih primerih so mesta pritrditve lahko na celični kapsuli, flagelih ali celo na pilijih. Prenos genetskega materiala v gostiteljsko celico je po pritrditvi raznolik in odvisen od morfologije virusa (Lood in Collin 2012).



Slika 2: Tipični bakteriofag (William in sod. 2007)

Mednarodni komite taksonomije virusov (ICTV, angl. The International Committee on the Taxonomy of Viruses) uvršča bakteriofage v 13 družin, glede na morfologijo in nukleinske kisline. Več kot 95% vseh opisanih bakteriofagov sodi v red *Caudovirales* repatih dsDNK bakteriofagov. Znotraj reda uvrščamo tri družine, ki se razlikujejo glede na morfologijo repa: 60% bakteriofagov z dolgimi in fleksibilnimi repi uvrščamo v družino *Siphoviridae*, 25% bakteriofagov z dvoslojnimi in kontraktilnimi repi v družino *Myoviridae* in 15% bakteriofagov s kratkimi in togimi repi v družino *Podoviridae*. Poliedrični, filamentozni in pleomorfni bakteriofagi predstavljajo le 3 do 4 % preučenihih bakteriofagov in spadajo v 10 družin, nekateri izmed njih so zelo majhni (Sabour in Griffiths 2010).

Bakteriofagi imajo lahko dva življenjska cikla in sicer: virulentni (litični) ali latentni (lizogen). Virulentni cikel povzroči hitro lizo in smrt gostiteljske bakterije. Pri latentnem ciklu bakteriofag del svojega cikla preživi v fazi mirovanja, ki mu pravimo profagija.

Razmnoževanje s profagi omogoča sekvenčno raznolikost, očitno pa je imelo pomembno vlogo v evoluciji. Pogosto bakterija uporabi bakteriofagne gene, ki so zanjo koristni, vključno s toksini in ostalimi virulentnimi faktorji (Sabour in Griffiths 2010). Pri latentnem ciklu je virusna DNK pogosto integrirana v gostiteljski DNK. Profagna DNK je podvojena skupaj z gostiteljsko celico, samo lizo celice pa lahko sprožimo tako, da celice izpostavimo stresu kot so mutageni agensi, temperatura ali ultravijolična svetloba. V večini vsi dsDNK bakteriofagi proizvedejo encime, ki delujejo na bakterijski peptidoglikan. To so lahko lizosomi, ki napadejo vezi med sladkorji, endopeptidaze, ki napadejo peptidne vezi ali pa amidaze, ki napadejo amidne vezi. Ti litični encimi, ki jih imenujemo tudi muralitični encimi ali endolizini, so proizvedeni znotraj citoplazme, vendar potrebujejo še encim holin, ki uniči membrano in jim tako omogoči pot do peptidoglikana. Holin kontrolira čas celične lize in sprostitve novih bakteriofagov. Čas od infekcije do lize gostiteljske celice in sprostitve bakteriofagov se imenuje latentna perioda, čas od adsorpcije do prvega bakteriofaga pa eklipsna perioda (Lewin in sod. 2011).

Ali bo bakteriofag vstopil v virulentni ali latentni cikel je odvisno od razmer infekcije in genotipa bakteriofaga ter bakterije (Lood in sod. 2008). Znano je, da lahko bakteriofagi z gostiteljem vstopijo tudi v drugačne življenjske cikle, ki pa niso dobro raziskani. Delimo jih na: trajno okužbo, psevdolizogenijo, nosilno stanje ter kronično infekcijo. Pogosto za vse, razen kronične infekcije, velja da bakteriofagna DNK ni integrirana v bakterijski kromosom, vendar ostaja kot plazmid. Kronična infekcija je okarakterizirana kot izpust bakteriofaga iz bakterije, brez povzročitve lize (Lood in Collin 2012).

1.4.2 Potencial bakteriofagov kot nov način zdravljenja

Enega izmed prvih primerov uporabe bakteriofagov v terapevtske namene sta objavila Bruynoghe in Maisin leta 1921, ki sta opazila zmanjšanje otekline in bolečine po uporabi stafilokoknega bakteriofaga pri zdravljenju stafilokokne kožne bolezni. Veliko zgodnjih bakteriofagnih terapij je bilo uspešnih, večje farmacevtske družbe so tudi prodajale preparate z bakteriofagi (npr. L'Óreal v Franciji in Lilly v Združenih državah Amerike). Zaradi nepopolnega razumevanja bakteriofagne biologije in manjše natančnosti diagnostičnih tehnik bakteriologije, dostopnih v tistem času, vključno z neuspehi v začetkih bakteriofagne terapije, se je zmanjšalo zanimanje v Zahodni Evropi in Ameriki. Hkrati so se začeli razvijati antibiotiki, ki so ponudili hitro in učinkovito rešitev, zaradi širšega spektra delovanja (Sabour in Griffiths 2010).

Široka uporaba antibiotikov je tako pri ljudeh kot živalih pripeljala k rasti številnih bakterij, odpornih na širok spekter antimikrobnih sredstev, kar močno vpliva na potek zdravljenja. Kot rezultat iskanja komplementarnih snovi antibiotikom, je bakteriofagna terapija ponovno

postala zanimiva za namene preprečevanja in zdravljenja infekcijskih bolezni. Bakteriofagi so že bili testirani in uporabljeni kot protiinfekcijsko sredstvo pri človeku in živalih, uporabljajo pa se tudi bakteriofagno kodirani litični proteini. Uporaba striktno virulentnih bakteriofagov je neškodljiva za človeka in živali (Kutateladze in Adamia 2010). Dodatno so bakteriofagi skozi leta postali zanimivi tudi zaradi sposobnosti pri uničevanju biofilma (Son in sod. 2010; Gutiérrez in sod. 2012).

1.4.3 Bakteriofagi *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*

Bakteriofagi specifično napadejo le tarčno bakterijo, izolirani pa so iz istega mesta kot njegovi gostitelji, saj so odvisni od slednjega, da se lahko razmnožujejo (Brüggemann in Lood 2013). Zaradi tega smo v nadaljevanju predstavili bakteriofage obeh bakterij oz. nekaj študij in objav v zadnjih letih.

1.4.3.1 Bakteriofagi *Propionibacterium acnes*

Prvi bakteriofag je bil identificiran leta 1964, kot bakteriofag *Corynebacterium acnes*, ki je pravzaprav današnja *P. acnes*. Vsi nadaljnji bakteriofagi niso bili natančno okarakterizirani, vendar so jih uporabljali za identifikacijo oz. klasifikacijo družin *Corynebacterium* in *Propionibacterium* (Brüggemann in Lood 2013).

Prvi sekvenciran bakteriofag *P. acnes* so objavili Ferrar in sod. (2007). PA6 je morfološko in genetsko zelo podoben mikobakteriofagom. Ima ikozaedrično glavo in dolg, tog rep, kar je značilnost za družino *Siphoviridae*. Njegov genom ne vsebuje genov za lizogenijo. Nadaljnje genomske analize bi lahko pokazale ali se je razvil iz večjega genoma latentnega bakteriofaga. Bakteriofag PA6 je liziral vse izolirane seve *P. acnes* v študiji in naredil jasne plake s turbidnim centrom, ni pa liziral ostalih predstavnikov iz rodu *Propionibacterium*. Ugotovili so prisotnost kripričnega profaga znotraj genoma seva *P. acnes* KPA171202, kar kaže na to, da so bakteriofagi *P. acnes* sposobni integracije v bakterijski genom.

Lood in sod. (2008) so na vzorcih, izoliranih iz kože in globljih infekcij ugotovili, da so latentni bakteriofagi pogosti pri *P. acnes*. Od tega jih več kot 70% nosi inducirane bakteriofage. V študiji so z mitomicinom C inducirali in okarakterizirali 65 zmernih bakteriofagov iz različnih sevov *P. acnes*. Vse so uvrstili v družino *Siphoviridae* in jih nadalje delili na različne skupine, glede na razlike v dveh genih, ki kodirata putativni glavni protein glave in amidaze. Ugotavljali so stopnjo nosilnosti induciranih latentnih bakteriofagov v različnih biotipih in ugotovili, da ima biotip IB najmanjšo nosilnost, izolati tega biotipa iz globljih infekcij pa je sploh nimajo. V nadaljevanju so v članku Lood in Collin (2012) s preučevanjem genoma na dveh bakteriofagih, izoliranih iz prejšnje študije ugotovili, da je

prisotna velika homolognost med ostalimi bakteriofagi *P. acnes*. Domnevajo, da genom preučenih bakteriofagov ni vstavljen v bakterijskega, vendar ima najverjetneje pseudolizogen življenjski cikel.

V članku Marinelli in sod. (2012) so raziskovalci preverjali sorodnost med bakteriofagi, ki so bili izolirani iz različnih delov sveta in primerjali % GC (odstotek baz, ki ga predstavljajo gvanini in citozini), nukleotidno identiteto in vsebnost genov. Čeprav bakteriofagi *P. acnes* kažejo na širok nabor gostiteljev na kliničnih izolatih, so izolirali dva seva bakterij, ki sta pokazala odpornost na več bakteriofagov. Ko se pojavi odpornost je ta potrjena z detekcijo kromosomsko kodiranih elementov imunosti v genomu gostitelja. V študiji so povzeli, da je omejena raznolikost bakteriofagov *P. acnes* povezana z unikatnim evolucijskim omejitvami, ki se nahajajo v lipidno bogatih anaerobnih okoljih v katerih njihov bakterijski gostitelj uspeva, hkrati pa se v pilosebacealnih enotah ne nahajajo druge bakterije in njihovi bakteriofagi. Glede na % GC baz je možno, da so bakteriofagi potomci skupnega prednika ali pa lahko homogenost pripišemo učinku ozkega grla, ki je eliminiral ostale bakteriofage in je tako ostal le dominanten genotip.

1.4.3.2 Bakteriofagi *Staphylococcus epidermidis*

Tipično so izolirane bakteriofage *S. epidermidis* uporabljali za tipizacijo sevov. Številni virulentni dejavniki identificirani pri *S. epidermidis* so vzpostavljeni preko horizontalnega genskega prenosa. Zaradi visokega rekombinantnega potenciala igrajo bakteriofagi pomembno vlogo v dogodkih tovrstnega transferja. Dva bakteriofaga s celotno genomsko sekvenco sta v študiji Daniel in sod. (2007) pokazala visoko homogenost, vendar sta se razlikovala v lizogeniji in DNK replikacijskih modelih. Filogenetska preiskava, v kateri so bakteriofaga primerjali z vsemi znanimi *Siphoviridae*, je pokazala, da sta bakteriofaga bližje bakteriofagom *S. aureus*.

Gutiérrez in sod. (2010) so izolirali tri različne bakteriofage z indukcijo s pomočjo mitomicina C iz vzorcev mleka doječih mater. Med seboj so bili podobni v morfologiji plakov, strukturi, vzorcu proteinov, DNK restriksijskih mestih in naboru gostitelja, bili pa so tudi podobne velikosti in predstavniki družine *Siphoviridae*. Eden izmed njih je pokazal naravo virulentnega bakteriofaga.

Do sedaj so uspeli izolirati le latentne bakteriofage, v študiji Aswan in sod. (2011) pa so raziskovalci uspeli izolirati virulentne bakteriofage iz nosnic, ki lahko predstavljajo rezervoar za nove antimikrobe. Hkrati so ugotavljali ali lahko bakteriofagi igrajo vlogo pri tekmovanju med *S. epidermidis* in *S. aureus*.

V študiji Melo in sod. (2014) so izolirali in okarakterizirali miovirus SEP1, ki je soroden rodu *Twortlikevirus*. Je visoko specifičen na seve *S. epidermidis* in ima dobro infekcijsko sposobnost oz. litični spekter. Lahko bi se ga uporabljalo pri zdravljenju antibiotsko odpornih sevov in pri biofilmu, vendar bo potrebno izvesti študije in potrditi njegovo učinkovitost *in vivo*.

V študijah bakteriofagov *P. acnes* in *S. epidermidis* torej prevladujejo latentni bakteriofagi, raziskave potencialnih virulentnih bakteriofagov pa so še v fazi razvoja. Nadaljnje raziskave bodo še naprej razkrivale skrivnosti bakteriofagov in njihovih povezav, ter njihov vpliv na gostitelja, kar bo vodilo v boljše razumevanje procesov in učinkovitejšo uporabo bakteriofagov v terapevtske namene.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 MATERIALI

V tem podpoglavju so predstavljeni vsi materiali, ki smo jih uporabljali v eksperimentalnem delu magistrske naloge. V veliki večini smo navedene materiale uporabljali za oba bakterijska rodova. Materiali, ki smo jih uporabljali le za en bakterijski rod so označeni posebej.

2.1.1 Bakterijski sevi

Poleg sevov, ki smo jih izolirali v okviru naloge smo uporabljali tudi seve, ki smo jih pridobili iz Ortopedske bolnišnice Valdoltra, ter tipske seve iz Nacionalne zbirke tipskih sevov (NCTC, angl. National Collection of Type Cultures) (Preglednica 1).

Preglednica 1: Seznam pridobljenih bakterijskih sevov

Ime seva	Bakterijska vrsta	Vir
SeV1	<i>S. epidermidis</i>	Valdoltra (vnetje tkiva, stegnenica (27.7.2012))
SeV2	<i>S. epidermidis</i>	Valdoltra (vnetje tkiva sklepne kapsule (6.7.2012))
SeV3	<i>S. epidermidis</i>	Valdoltra (vnetje tkiva sklepne kapsule (6.7.2012))
SeV3	<i>S. epidermidis</i>	Valdoltra (punkcija iz kolena (21.11.2012))
NCTC 13360	<i>S. epidermidis</i>	NCTC
Pa 2c/430	<i>P. acnes</i>	Valdoltra (stegnenica (24.1.2013))
NCTC 737	<i>P. acnes</i>	NCTC

2.1.2 Gojišča in pufri

Gojišča za izolacijo, gojenje in tudi kasnejšo izolacijo in namnoževanje bakteriofagov, smo pripravljali v skladu z navodili proizvajalca. Uporabljali smo osnovo za tekoča gojišča iz katerega smo z dodatkom agarja (Select agar, Sigma Aldrich, A5054) naredili mehka (0,7% agarja - soft agar) in trda gojišča (1,2% agarja - agar). Gojišča in pufre smo raztapljali v deionizirani vodi (dH₂O). Vsa gojišča in pufre smo pred uporabo sterilizirali v avtoklavu pri 121 °C, 15 minut. Po razdelitvi v petrijeve plošče ali falkonke smo jih do uporabe hranili v hladilniku pri 4 °C.

Osnovna gojišča, ki smo jih uporabljali za gojenje *S. epidermidis* in *P. acnes*:

- TSB: tripton soja bujon (Trypton Soya Broth, Oxoid, CM0129).
- BHI: možgansko srčni infuzijski bujon (Brain heart infusion, Merck, 1.10493.0500).
- Pri vseh gojiščih smo dodajali Select agar (Sigma Aldrich A5054).

Gojišča in pufri, ki smo jih uporabljali za gojenje *S. epidermidis*:

- MSA: Manitol solni agar (Mannitol Salt Agar) sestavljen iz: Lab-Lemco prašek (1 g/l), pepton (10 g/l Biolife), d-manitol (10 g/l Fluka), NaCl (75 g/l (Merck)), fenol rdeče (0,025 g/l (Merck)) in agar (15 g/l (Sigma Aldrich A5054))
- SM: Solno magnezijev pufer, sestavljen iz: 0,1 M NaCl (Merck), 0,01 % želatina (Sigma Aldrich), 8 mM MgSO₄ (Sigma Aldrich), 50 mM Tris pufer (Merck), pH 7,5.

Gojišča in pufri, ki smo jih uporabljali za gojenje *P. acnes*:

- TYG: Trypton kvasi ekstrakt z glukozo (Tryptone yeast glucose agar), sestavljen iz 1% triptona (Biolife 4122902), 0,5% kvasnega ekstrakta (BD) in 0,25% glukoze (Kemika). Gojišču smo dodajali tudi antibiotik furazolidon (Sigma Aldrich F9505) v končnih koncentracijah 2 ali 6 µg/ml.
- BHI: Možgansko srčni infuzijski bujon (Brain heart infusion, Merck, 1.10493.0500), ki se je uporabljal tudi z dodatki 0,5% kvasnega ekstrakta (BD) in 0,25% glukoze (Kemika). Gojišču smo dodajali tudi antibiotik furazolidon (Sigma Aldrich F9505) v končnih koncentracijah 2 ali 6 µg/ml.
- SM: Solno magnezijev pufer, sestavljen iz: 20 mM Tris-HCl, pH 7,5 (Merck), 0,1 M NaCl (Merck), 60 mM MgSO₄ (Sigma Aldrich), 0,01% želatina (Sigma Aldrich).

2.1.3 Pufri, reagenti, delovni kompleti ter druge kemikalije pri delu z bakterijami, bakteriofagi in DNA

- dH₂O- deionizirana voda
- Fiziološka raztopina
- 50% glicerol (Sigma Aldrich) za shranjevanje sevov.
- Komplet za barvanje po Gramu (Merck Millipore)
- Komplet za izolacijo genske DNK za Gram pozitiven bakterije (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, (Promega))
- 70 % etanol
- 50 mM EDTA (pH 8 (Kompleksal III, Semikem))
- 10 mg/ml lizocim (Sigma Aldrich)
- TBE pufer za agarozno gelsko elektroforezo (10x koncentriran) sestavljen iz Tris (108 g/L), borove kisline (55 g/l (Merck)) in EDTA (7.4 g/l) uravnan na pH 8.
- Agarozna (Sigma A9539) za pripravo 1% agaroznih gelov
- Barvilo za barvanje elektroforeznih agaroznih gelov Syber gold (Life Technologies)
- DNK standard 1 kb (GeneRuler, ThermoScientific) za elektroforezo
- Nalagalni pufer (6x gel loading dye, ThermoScientific) za elektroforezo
- Taq polimeraza (Thermo Scientific)
- Mešanica deoksinukleotidtrifosfatov (dNTP mix, Thermo Scientific)

- 10x PCR pufer (10 x Taq Buffer)
- UP dH₂O- očiščena, deionizirana in destilirana voda (Thermo Scientific)
- Komplet za čiščenje PCR produktov (QIAquick PCR purification kit, Thermo Scientific).
- 99,8 % etanol (Sigma Aldrich).
- Antibiotiki (Sigma Aldrich): Clindamycin, Doxycycline, Amoxycillin, Cephalothin, Erythromycin in Tetracycline.
- 1 % uranil acetat za negativno barvanje vzorcev za elektronsko mikroskopijo (Sigma Aldrich)

2.1.4 Seznam laboratorijskih pripomočkov

- Rokavice (Kimberly Clark)
- Laboratorijska halja (Sanolabor)
- Zaščitna očala
- Zaščitna obrazna maska
- Razkužilo Incidin (Ecolab) in varikina (Šampionka)
- Laboratorijska steklovina (Duran, Brand)
- Pribor za tehtanje
- Avtomatske pipete (Eppendorf in Gilson) in nastavki za avtomatske pipete s filtri (Sarsted)
- Plastične cepilne zanke (Labortechnika, Golias)
- Petrijeve plošče premera 70 in 90 mm (Labortechnika, Golias)
- 15 ml in 50 ml centrifugirke oz. falkonke (Sterlin)
- 1,5 ml krioeprovete (Heto)
- 1,5 ml mikrocentrifugirke (Sarstedt)
- Mikrotitrne plošče (Iwaki)
- Injekcijske brizgalke (PB Plastik)
- 0,22 µm filter (Merck Millipore)
- Parafilm (Brand)
- Objektno stekelce
- Filter papir
- Anaerobne posode
- Generator anaerobne atmosfere (anaerobna vrečka za *P. acnes* (BioMérieux))

2.1.5 Seznam laboratorijske opreme

- Inkubator (Tehnica)

- Brezprašna komora (Iskra PIO)
- Tehnica (KERN PFB)
- Magnetno mešalo (Tehnica Železniki)
- pH meter (Mettler Toledo)
- Mikrovalovna pečica (Gorenje)
- Hladilnik (Gorenje, Zanussi)
- Zamrzovalnik (- 86 °C: Heto Ultra Freeze in - 20 °C: Gorenje)
- Avtoklav (Kambič A-21)
- Laboratorijska centrifuga (Sigma 3-16PK, Mini spin Eppendorf)
- Vorteksalnik ali vrtinčnik (Tehnica Železniki)
- Svetlobni mikroskop (Motic)
- Digitalni fotoaparati (Nikon)
- Čitalec mikrotitrskih plošč (Biotek)
- Elektroforezna banjica za agarozno elektroforezo in vir napetosti (Biorad)
- Termostat za PCR reakcije (CSL Gradient Thermal Cycler, Cleaver Scientific)
- Sistem za dokumentacijo gelov (E-box)

2.2 METODE DELA

Za izvedbo eksperimentalnega dela smo uporabljali standardne mikrobiološke tehnike in molekularne metode (Habulin in Primožič 2008; Jeršek 2013). Pri tem smo si pomagali tudi z metodami dela, ki so jih uporabljali drugi raziskovalci, ki so izolirali bakteriji *P. acnes* in *S. epidermidis* ter njihove bakteriofage.

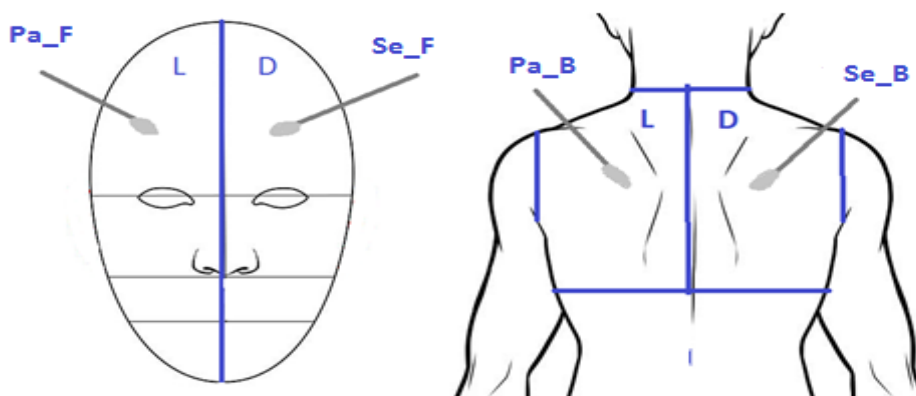
2.2.1 Vzorčenje

Vzorci za izolacijo *P. acnes* in *S. epidermidis* ter izolacijo bakteriofagov smo pridobili istočasno. Pri vzorčenju smo poskušali pridobiti tudi določene podatke oseb, ki smo jim odvzeli vzorce; spol, starost in uporaba antibiotikov za zdravljenje aken.

Pridobili smo tri vrste vzorcev, ki smo jih razdelili v kategorije:

- brisi kože obraza in hrbta,
- vzorci aken,
- vzorci pridobljeni s pomočjo trakov za čiščenje kože (Cadea Vera, CV Clear up strips za čiščenje por).

Brise kože obraza in hrbta smo odvzeli tako, da smo paličico, ki je bila namočena v 2 ml fiziološke raztopine, s pritiskom podrgnili po koži obraza in hrbta, za vsako bakterijo na drugi polovici obraza oz. hrbta (Slika 3). Paličico smo vstavili nazaj v epruveto in epruveti z vzorci *P. acnes* še dodatno vstavili v vrečo z dodanim generatorjem anaerobne atmosfere, v nadaljevanju z anaerobno vrečko. V laboratoriju smo vzorcem dodali 10 krat koncentrirano tekoče gojišče BHI do končne enkratne koncentracije in inkubirali, s stresanjem 24 ur pri 37 °C, vzorce *S. epidermidis* aerobno, vzorce *P. acnes* pa v anaerobnih posodah z dodano anaerobno vrečko, v nadaljevanju anaerobno.



Slika 3: Sistem vzorčenja z vatirano paličico na obrazu (Pa_F in Se_F) in hrbtu (Se_B in Pa_B).

Vzorci aken smo pridobili na način, da smo s sterilnim filter papirjem odvzeli vzorec iztisnjenih aken. Filter papir smo vstavili v 15 ml falkonko v kateri je bilo 3 ml fiziološke raztopine. Vzorce smo, kot v prvem primeru, vzeli za vsako bakterijo posebej in *P. acnes* vzorce dodatno shranili z anaerobno vrečko. Med transportom od mesta vzorčenja do laboratorija so bili vzorci hranjeni pri 4 °C. V laboratoriju smo vzorcem dodali 10 krat koncentrirano tekoče gojišče BHI do končne enkratne koncentracije in inkubirali, s stresanjem, 24 ur pri 37 °C, vzorce *S. epidermidis* aerobno, vzorce *P. acnes* anaerobno.

Vzorci pridobljene s trakovi za čiščenje kože smo pridobili tako, da si je oseba trak nanesla na nos, ki si ga je predhodno navlažila z vodo. Po 15 minutah smo trak odstranili in celega vstavili v petrijevo ploščo (90 mm) s 5 ml tekočega gojišča BHI, ter inkubirali 2 uri pri močnem stresanju. Vsebino smo nato prepolovili in prelili v 15 ml falkonke. Eno polovico smo inkubirali anaerobno, za izolacijo *P. acnes*, drugo polovico pa aerobno, za izolacijo *S. epidermidis*, obe pri 37 °C.

Naknadno smo pridobili tudi dva vzorca gnojnega izcedka iz oči. Vzorca sta bila odvzeta z vatirano paličico in vstavljena v 2 ml fiziološke tekočine, nato pa smo jima dodali 10 krat koncentrirano tekoče gojišče BHI do končne enkratne koncentracije in inkubirali s stresanjem, 24 ur pri 37 °C.

Vzorci smo poimenovali glede na bakterijo Pa za *P. acnes* in Se za *S. epidermidis*. Sledila je črka, ki je označevala vzorec in sicer; F za obraz, B za hrbet, A za vzorec aken, S za strip, E za oko, D za dermatologinjo in K za kozmetičarko. Vzorcju sledila številka osebe. Primer: SeS1- *S. epidermidis*, vzorec nosnega traku, oseba 1.

2.2.2 Izolacija bakterij iz vzorcev

Po 24 urni inkubaciji smo vzorce nacepili na selektivna gojišča, plošče premera 70 mm. Vzorce *S. epidermidis* smo nanegli na gojišče MSA, vzorce *P. acnes* pa na trdo gojišče BHI z dodanim antibiotikom s koncentracijo 2 µg/ml furazolidona (v nadaljevanju BHI+2F).

Za izolacijo *S. epidermidis* smo inokulirana gojišča MSA inkubirali dva dneva pri 37 °C, aerobno. Po inkubaciji smo pregledali gojišča in iz vsake plošče prenesli eno kolonijo, jasno ločeno od ostalih, na novo gojišče MSA. To smo naredili še dvakrat, da smo zagotovili izolacijo le enega klona oz. seva bakterije. Nazadnje smo nacepili eno kolonijo na trdo gojišče TSB za nadaljnjo obravnavo. Seve smo ustrezno označili in shranili tako, da smo eno kolonijo prenesli v 4 mL tekočega gojišča TSB. Po 24 urni inkubaciji smo prenesli 40 µL gojišča s bakterijsko kulturo v 4 mL svežega tekočega gojišča TSB, ter inkubirali toliko časa, da je bila optična gostota pri 600 nm (OD_{600} , angl. optical density) okoli 0,147. Vzeli smo 600 µl bakterijske suspenzije, ki smo ji dodali 200 µl tekočega gojišča BHI in 200 µl 50% glicerola. Vsebino smo razdelili po predhodno označenih krioepruvetah in shranili pri -20 in -80 °C.

Za izolacijo *P. acnes* smo inokulirana gojišča BHI+2F inkubirali sedem dni pri 37 °C, anaerobno. Precepili smo eno kolonijo, jasno ločeno od ostalih, na trdo gojišče BHI, vendar z večjo koncentracijo furazolidona; 6 µg/ml (v nadaljevanju BHI+6F). To smo naredili še dvakrat in vsakič inkubirali od 2 do 3 dni, odvisno od intenzivnosti rasti, pri 37°C, anaerobno. Nazadnje smo nacepili kolonijo še na trdo gojišče BHI za nadaljnjo obravnavo. Seve smo shranili tako, da smo celotno biomaso na plošči, ki smo ji predhodno dodali 2 ml tekočega gojišča BHI, postrgali, odpipetirali vsebino v 15 ml falkonko in dodali 50% glicerol do končne 20% koncentracije. Vsebino smo razdelili po predhodno označenih krioepruvetah, ter shranili pri -20 in -80 °C.

2.2.3 Določanje identitete izoliranih sevov

Izolirali smo genomsko DNK iz vseh izoliranih sevov. Identificirane seve smo barvali s kompletom za barvanje po Gramu, preparate pa smo nato pregledali s svetlobnim mikroskopom ter vzorce tudi fotografirali. Na koncu smo z metodo difuzije diskov določili še občutljivost bakterij na antibiotike.

2.2.3.1 Izolacija DNK

Seve *S. epidermidis* in *P. acnes* smo nagojili ter na gojišče nanegli 1 ml tekočega gojišča TSB, postrgali biomaso in vsebino odpipetirali v sterilno mikrocentrifugirko. Sledili smo navodilom proizvajalca kompleta za izolacijo genomske DNK za Gram pozitivne bakterije (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega A1125). Uspešnost izolacije smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo. Pripravili smo 1% agarozni gel, ki smo ga prenesli v banjico za elektroforezo in ga prelili z enkratnim pufrom TBE. V posamezen žepček smo nanegli po 5 µl izolata in 1 µl nalagalnega pufru (6x gel loading dye, ThermoScientific), v prvega pa mešanico 1 µl nalagalnega pufru, 1 µl standarda DNK (1kb GeneRuler, ThermoScientific) in 4 µl UP dH₂O. Elektroforeza je potekala 60 min pri napetosti 100 V in 400 A. Po navodilih proizvajalca smo gel 30 minut barvali z barvilom Syber gold (Life Technologies). Gel smo na koncu dokumentirali s sistemom E-Box. Uspešno izolirano genomsko DNK sevov smo uporabili pri nadaljnji identifikaciji.

2.2.3.2 Pomnoževanje gena za 16S rRNK z verižno polimerazo

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction) za gen 16S rRNK smo izvedli po predhodno opisanem postopku (Woese in sod. 1975; Žnidaršič Bovhan 2012). V PCR komori za pripravo mešanice za PCR smo pripravili mešanico PCR (Preglednica 2) do končnega volumna 25 µl. Reakcijsko mešanico PCR v mikorcentrifugirkah smo vstavili v termostat za reakcije PCR in vnesli program (Preglednica 3).

Preglednica 2: Reakcijska mešanica za PCR

Sestavine PCR mešanice	Končna koncentracija ali volumen
10 x pufer PCR (10 x Taq Buffer)	1 x
mešanica deoksinukleotidtrifosfatov (dNTP)	20,5 µM (vsakega)
Taq polimeraza	0,05 U/ml
oligonukleotid fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3')	0,25 µM
oligoukneotid RU1406 (5'-ACG GGC GGT GTG TRC-3')	0,25 µM
gDNK bakterij	1 µl
UP dH ₂ O	dopolnitev do volumna 25 µl

Preglednica 3: PCR program

Stopnja	Število ciklov	Temperatura	Čas
Iniciacija	1	95 °C	5 min
Denaturacija	30	95 °C	30s
Stopnja pripenjanja		60 °C	30s
Podaljševalna stopnja		72 °C	1:15min
Zaključno podaljševanje	1	72 °C	5 min

Po koncu programa smo ponovili agarozno gelsko elektroforezo po enakem postopku kot je opisan pri podpoglavju 2.2.3.1, da smo preverili uspešnost PCR reakcije. PCR pomnožke smo očistili s kompletom za čiščenje PCR pomnožkov, po navodilih proizvajalca (QIAquick PCR purification kit, Thermo Scientific, 28104). Odpipetirali smo 5 µl očiščenega PCR pomnožka in mu dodali 5 µl oligonukleotida RU1406 ter označene mikrocentrifugirke poslali na ugotavljanje nukleotidnega zaporedj (GATC Biotech, Nemčija).

2.2.3.3 Ugotavljanje vrste bakterij in izris filogenetskega drevesa

Pridobljene sekvence smo uredili s programom FINCHtv tako, da smo jim izrezali sprednje in zadnje konce, ki so imeli šum v informaciji. Z orodjem za lokalno poravnavanje zaporedij (BLAST, angl. Basic Local Alignment Search Tool) smo v bazi podatkov poiskali sorodne sekvence. S programom za analizo molekularne evolucijske genetike (MEGA6, angl. Molecular Evolutionary Genetics Analysis) smo izrisali filogenetsko drevo za vsak rod bakterije posebej in drevo vseh identificiranih bakterij. V programu smo uporabili statistično metodo največje verjetnosti (angl. maximum likelihood), filogenetski test vezanja (angl. bootstrap) s 500 naključnimi ponovitvami in nukleotidni substitucijski model Tamura Nei. Rezultate smo primerjali z rezultati BLAST-a.

2.2.3.4 Rastna krivulja

Izbrali smo po dva izolata na bakterijsko vrsto in s spremljanjem števila kolonijskih enot na mililiter (CFU/ml, angl. Colony Forming Unit) in optične gostote pri 600 nm (OD₆₀₀, angl. Optical Density) izrisali rastno krivuljo v odvisnosti od časa. Pred nacepitvijo smo odmerili OD₆₀₀ tekočega gojišča, saj smo vrednost odšteli od vrednosti OD₆₀₀ bakterijske kulture in tako dobili dejanski podatek o rasti.

Formula za izračun števila kolonijskih enot na mililiter:

$$N = \frac{\Sigma C * R}{0,1}$$

Legenda:

N: koncentracija celic (CFU/ml)

ΣC: povprečje vsote kolonij

R: redčitev

0,1: volumen vzorca v ml

2.2.3.4.1 Rastna krivulja *P. acnes*

Seva *P. acnes* PaNCTC737 in Pa2c/430 smo iz -80 °C nacepili na trdo gojišče BHI. Čez 48 ur smo v 5 ml tekočega gojišča BHI nacepili nekaj biomase (za konico cepilne zanke, pb. 10 kolonij) posameznega seva in inkubirali pri 37 °C, anaerobno, pri 110 rpm. Oba podatka, OD₆₀₀ in CFU/ml smo spremljali ob času 0 in nato vsakih 24 ur, skupno 4 dni.

CFU/ml smo spremljali tako, da smo odvzeli 100 µl bakterijske kulture in ga redčili po Kochu, od 10⁻¹ do 10⁻⁶, v 900 µl tekočega gojišča BHI. 100 µl posamezne redčitve smo odpipetirali na trdo gojišče BHI in jih inkubirali 48 ur pri 37 °C, anaerobno. Po inkubaciji, smo prešteli plošče, ki smo jih obravnavali kot števne, če so imele med 30 in 300 kolonij.

OD₆₀₀ smo merili tako, da smo odpipetirali 100 µl bakterijske kulture v mikrotitrsko ploščico in slednjo vstavili v čitalec mikrotitrskih plošč (Biotek).

2.2.3.4.2 Rastna krivulja *S. epidermidis*

Seva *S. epidermidis* SeV1 in SeNCTC13360 smo iz -80 °C nacepili na trdo gojišče TSB. Po 24 urni inkubaciji smo prenesli po eno kulturo v 4 ml svežega tekočega gojišča TSB, ter ponovno inkubirali 24 ur, aerobno pri 37 °C, 120 rpm. Naslednji dan smo v 4 ml tekočega gojišča vnesli 40 µl bakterijske kulture. Oba podatka, OD₆₀₀ in CFU/ml smo spremljali v času 0, 4, 8, 25, 29 in 33h.

CFU/ml smo spremljali tako, da smo 100 µL bakterijske kulture redčili po Kochu od 10⁻¹ do 10⁻⁶ v 900 µL tekočem gojišču TSB. 100 µL vsake redčitve smo odpipetirali na trdo gojišče TSB in jih inkubirali aerobno pri 37 °C, 24 ur. Po inkubaciji smo prešteli kolonije na ploščah, ki so imele med 30 in 300 kolonij.

OD₆₀₀ smo merili tako, da smo odpipetirali po 200 µl bakterijske kulture v mikrotitrsko ploščo, ki smo jo nato vstavili v čitalec mikrotitrskih plošč (Biotek).

2.2.3.5 Občutljivost bakterij na antibiotike

Občutljivost bakterij na antibiotike smo preverjali z metodo difuzije diskov (angl. Disc Diffusion Method). Pripravili smo diske iz filtrirnega papirja (premer 6 mm) in jih dali sterilizirati. Vzgojili smo bakterijsko kulturo do koncentracije 10⁷ CFU/ml. Da smo dosegli enakomerno razporeditev bakterij po gojišču, smo na označenih ploščah pripravili plošče s konfluentno rastjo bakterij po enakem postopku kot v podpoglavju 2.2.4.1, le da smo pri sevih *P. acnes* uporabljali trdo gojišče BHI z dodanimi hranili, brez furazolidona. Pripravili smo

ustrezne založne koncentracije izbranih antibiotikov, ki se uporabljajo pri zdravljenju aken, za kontrolo pa smo uporabili sterilizirano dH₂O v kateri smo pripravili ustrezne koncentracije. Na filter papirčke, ki smo jih razporedili v sterilnih petrijevih ploščah, za vsak antibiotik posebej, smo nanесли 20 µl vsakega antibiotika in počakali od 20 do 30 minut, da so se diski posušili. Na gojišča z bakterijo smo nanесли posamezen disk z antibiotikom. Gojišča smo inkubirali 24 ur, pri 37°C, anaerobno za seve *P. acnes* in aerobno za seve *S. epidermidis*.

Po inkubaciji smo preverili in izmerili cone lize okoli diskov in uvrstili seve med odporne ali občutljive (Preglednica 4) (Zandi in sod. 2010; Varshney 2013).

Preglednica 4: Koncentracije antibiotikov in velikost premera za ugotavljanje občutljivosti bakterij na antibiotike.

Antibiotik	Koncentracija (µg/ml)	Odpornost (mm)	Občutljivost (mm)
Klindamicin	2	≥ 14	≤ 15
Tetraciklin	30	≥ 14	≤ 15
Doksiciklin	30	≥ 12	≤ 13
Cefalotin	30	≥ 17	≤ 18

2.2.4 Izolacija, čiščenje in namnoževanje bakteriofagov

Ko smo identificirali bakterije, smo iz istih vzorcev iz katerih smo izolirali bakterije, poskušali pridobiti tudi bakteriofage. Preden smo lahko začeli s tem delom raziskave, smo morali razviti ustrezne plošče s konfluentno rastjo bakterij. Temu je sledila izolacija bakteriofagov, čiščenje, ter na koncu določanje titra in shranjevanje.

2.2.4.1 Priprava plošč s konfluentno rastjo bakterij za delo z bakteriofagi.

Cilj pri pripravi plošče s konfluentno rastjo bakterij, v nadaljevanju bakterijsko travico (angl. bacterial lawn), je bil enakomerna bakterijska rast, ki je bila dovolj intenzivna, da so bile jasno vidne cone lize. Da bi bila priprava čim bolj učinkovita in časovno optimalna, smo za vsako bakterijo poskusili dva protokola in se odločili za najboljšega.

2.2.4.1.1 Protokol za pripravo bakterijske travice *P. acnes*

Bakterijsko travico *P. acnes* smo poskušali pripraviti glede na rezultate rastne krivulje. Shranjena seva iz -80 °C, smo nacepili na 70 mm ploščo s trdim gojiščem BHI in inkubirali 48 ur pri 37 °C, anaerobno.

Prvi protokol: Precepili smo 5 kolonij v 5 ml svežega tekočega gojišča BHI v 15 ml falkonki in izmerili začetno OD₆₀₀. Falkonko smo inkubirati pri 37 °C, anaerobno na stresanju (120

rpm) in spremljali OD₆₀₀ dvakrat na dan dokler ni dosegel vrednosti okoli 0,22. 500 µl bakterijske kulture smo vnesli v 5 ml mehkega gojišče BHI in razlili na trdo ploščo BHI+6F, 90 mm. Počakali smo, da se je mehki agar strdil in ploščo inkubirali 24 ur pri 37 °C, anaerobno.

Drugi protokol: Na gojišče smo odpipetirali 2 ml tekočega BHI gojišča in postrgali celotno biomaso. Vsebino smo prenesli v 15 ml falkonko in izmerili njen OD₆₀₀. Glede na rezultat smo bakterijsko kulturo redčili v tekočem BHI gojišču, dokler ni OD₆₀₀ dosegel vrednosti okoli 0,25. 500 µl tako pripravljene bakterijske kulture smo odpipetirali v 5 ml tekočega gojišča BHI in razlili na trdo gojišče BHI+6F, 90 mm. Počakali smo, da se je mehki agar strdil in nato plošče inkubirali 24 ur pri 37 °C, anaerobno.

2.2.4.1.2 Protokol za pripravo bakterijske travice *S. epidermidis*

Bakterijsko travico *S. epidermidis* smo prav tako pripravili glede na rezultate rastne krivulje. Shranjene seve iz -80 °C smo nacepili na 70 mm plošče s trdnim gojiščem TSA in inkubirali 24 ur pri 37 °C, aerobno.

Prvi protokol: Precepili smo eno kolonijo v 4 ml tekočega gojišča TSB v 15 ml falkonki in jo inkubirali pri 37 °C, 20 ur, 120 rpm. Naslednji dan smo prenesli 40 µl bakterijske kulture v 4 ml svežega tekočega gojišča TSB in izmerili OD₆₀₀, ki je moral biti okoli 0,147. Inkubirali smo, dokler vrednost ni bila ustrezna. Po inkubaciji smo 100 µl bakterijske kulture odpipetirali v 5 ml mehkega gojišča TSB in vsebino razlili na 90 mm plošče. Ko se je mehki agar strdil, smo plošče inkubirali pri 37 °C, aerobno, 24 ur.

Drugi protokol: Celotno biomaso smo postrgali s plošče, na katero smo predhodno odpipetirali 1 ml tekočega gojišča TSB. Vsebino smo odpipetirali v 15 ml falkonko in izmerili OD₆₀₀. Glede na izmerjen OD₆₀₀ smo bakterijsko kulturo redčili do vrednosti okoli 0,147. Ponovno smo odpipetirali 100 µl kulture v 5 ml mehkega gojišča TSB in vsebino razlili na 90 mm plošče. Ko se je mehki agar strdil, smo plošče inkubirali pri 37 °C, aerobno, 24 ur.

2.2.4.2 Izolacija bakteriofagov

Izolacija bakteriofagov je potekala z metodo nakapljanja (angl. spot assay). Pripravili smo bakterijsko kulturo in travico po zgoraj opisanem postopku, le da smo plošče tokrat označili in razdelili na polja, na katera smo nato nanašali vzorce. Vsak vzorec smo redčili od 10⁻¹ do 10⁻⁵ v tekočem gojišču BHI, da smo izključili možnost, da so cone lize rezultat delovanja bakteriocinov. Ko se je travica strdila, smo v vsako polje nanесли po 10 µl posamezne redčitve, vključno z neredčenim vzorcem, torej je bilo za vsak vzorec na plošči namenjenih 6 polj. Na

90 mm ploščo smo lahko nanesti redčitve petih vzorcev. Na vsako ploščo smo nanesti tudi 10 μ l tekočega gojišča BHI, ki je služil kot negativna kontrola.

Za izolacijo bakteriofagov *P. acnes* smo uporabljali seve NCTC737, Pa2c430, PaA1, PaD4, PaF3 in PaS10. Ko so se vzorci na plošči posušili, smo plošče inkubirali 24 ur pri 37 °C, anaerobno. Za izolacijo bakteriofagov *S. epidermidis* smo uporabljali seve SeV1, SeV2, SeS1, SeS2, SeB5, SeF6. Plošče z nanešenimi vzorci smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, aerobno.

Naslednji dan smo pregledali plošče in si zapisali rezultate metode nakapljanja. Kjer smo opazili cono lize oz. plak smo ga s cepilno zanko, skupaj z mehkim gojiščem, izrezali in vstavili v označeno mikrocentrifugirko s 150 μ l pufra SM, ki je bil pripravljen za vsako bakterijo posebej (glej poglavje 2.1.2). Mikrocentrifugirke smo shranili pri 4 °C preko noči, da so se bakteriofagi sprostili iz gojišča v pufer SM. Naslednji dan smo vsak vzorec centrifugirali, 5 minut na 9000 x g. 130 μ l supernatanta smo prenesli v čisto mikrocentrifugirko, ponovili centrifugiranje in nato prenesli 100 μ l supernatanta. Mikrocentrifugirke smo ustrezno označili in shranili pri 4 °C do nadaljnje uporabe.

2.2.4.3 Čiščenje bakteriofagov

Čiščenje bakteriofagov oz. plakov je potekalo z metodo plakov (angl. plaque assay). Ponovno smo morali pripraviti bakterijske seve za pripravo bakterijske travice, na katerih so se pri metodi nakapljanja pojavili plaki. Izločene plake smo redčili v mikrocentrifugirkah s pufrom SM (od 10^{-1} do 10^{-5}). V 100 μ l posamezne redčitve plaka smo odpipetirali 500 μ l kulture seva *P. acnes* oz. 100 μ l kulture seva *S. epidermidis*. Vsebinsko v mikrocentrifugirkah smo vorteksirali in jo inkubirali pri 37 °C za 15 minut, da je potekla vezava bakteriofagov.

Po inkubaciji smo celotno vsebinsko posamezne mikrocentrifugirke odpipetirali v 5 ml mehkega gojišča TSB (*S. epidermidis*) oz. BHI (*P. acnes*), vorteksirali in razlili na označeno trdo gojišče. Za pozitivno kontrolo smo uporabili enak volumen bakterijske kulture (le brez vzorca plaka), za negativno kontrolo pa 100 μ l pufra SM. Vsako smo odpipetirali v ustrezno mehko gojišče in razlili na ustrezno trdo gojišče. Gojišča smo inkubirali 24 ur pri 37 °C, *P. acnes* anaerobno, *S. epidermidis* aerobno.

Naslednji dan smo prešteli plake na ploščah. Plošče so bile števne, če so vsebovale od 30 do 300 plakov. Zapisali smo si rezultate ter en plak ponovno izrezali in vstavili v 150 μ l ustreznega pufra SM. Označene mikrocentrifugirke smo inkubirali pri 4 °C, da so se bakteriofagi sprostili v pufer SM.

Po inkubaciji preko noči smo plak centrifugirali kot pri metodi nakapljanja, ter ponovili celoten postopek. To smo naredili vsaj še dvakrat, s čimer smo zagotovili, da se je v pufru nahajal le en bakteriofag.

2.2.4.4 Določevanje titra in shranjevanje

Po zadnjem čiščenju plakov smo izbrali gojišče, ki je bilo čim bolj konfluentno oz. čim bolj zapolnjeno s plaki. Na tako gojišče smo odpipetirali 3 ml ustreznega pufra SM. Gojišče smo postavili na stresalno ploščat (120 rpm) in inkubirali 4 ure na sobni temperaturi.

Ko je potekel čas inkubacije, smo odpipetirali pufer SM v 15 ml falkonke in jih centrifugirali 10 min, 9000 x g. Supernatant smo prenesli v novo sterilno falkonko in ga filtrirali skozi 0,22 µm filter. S prefiltriranim supernatantom smo nato ponovili postopek, podobno kot pri metodi plakov. Po inkubaciji smo prešteli števne plošče in s formulo za izračun titra določili titer (PFU/ml, angl. Phage Forming Units/ml). Vsebino smo razdelili po krioeprevetah in shranili pri 4, -20 in -80°C.

Formula za izračun titra bakteriofagov

$$N = \frac{\Sigma C * R}{0,1}$$

Legenda:

N: koncentracija bakteriofagov (PFU/ml)

ΣC: povprečje vsote plakov (v primeru, da imamo paralelke)

R: redčitev

0,1: volumen vzorca v ml

2.2.5 Morfološka karakterizacija bakteriofagov, ter nabor gostitelja

2.2.5.1 Velikost in oblika plakov

Že med samo izolacijo in čiščenjem smo spremljali obliko plakov, ki smo jih opisovali glede na obliko roba in velikost.

2.2.5.2 Presevna elektronska mikroskopija

Za presevno elektronsko mikroskopijo (TEM, angl. Transmission Electron Microscopy) smo pripravili preparate, glede na to, kam so bili preparati poslani na analizo.

Na naparjeno stran bakrene mrežice smo nanесли 20 µl suspenzije bakteriofaga *S. epidermidis*. To smo inkubirali 5 minut in jo nato osušili na filtrirnem papirju. Z enim volumnom pipete

smo mrežico sprali z UP dH₂O. Mrežico smo ponovno osušili na filtrirnem papirju. Na napačno stran smo nakapljali kapljico 1% uranil acetata in jo takoj osušili na filtrirnem papirju, nato pa položili na čist filter papir, da se je posušila. Mrežico smo nato vstavili v škatlico in vzorec poslali na Nacionalni inštitut za biologijo (NIB) v Ljubljani, kjer so mrežice pregledali in nam posredovali rezultate.

Bakteriofagne mikroskopske preparate *P. acnes* smo naredili tako, da smo vzorec skupaj z mrežico centrifugirali 20 min, 180000 x g s centrifugo Airfuge. Mrežico smo kontrastirali s fosfor volframovo kislino in preparat poslali na Inštitut za Mikrobiologijo in imunologijo (IMI) v Ljubljani, kjer so mrežice pregledali in nam posredovali rezultate.

2.2.5.3 Nabor gostitelja

Za vse pridobljene vzorce smo želeli izvedeti, koliko sevov so sposobni lizirati. To smo naredili z metodo nakapljanja, tako da smo vse vzorce redčili na podoben titer, med $9,00 \times 10^6$ in $2,00 \times 10^7$ PFU/ml. Ko smo pripravili travico za vse seve, smo dvakrat odpipetirali 10 μ l vzorca na označeno mesto. Plošče z bakterijsko travico *P. acnes* smo inkubirali anaerobno, plošče z bakterijsko travico *S. epidermidis* pa aerobno, vse 24 ur pri 37 °C. Glede na intenzivnost lize smo plake ocenili z ocenami med 0 in 4; 0 vzorec sev ni liziral, 1 pojavili so se posamezni plaki, 2 veliko število še razvidnih plakov, 3 moten plak in 4 popolna liza.

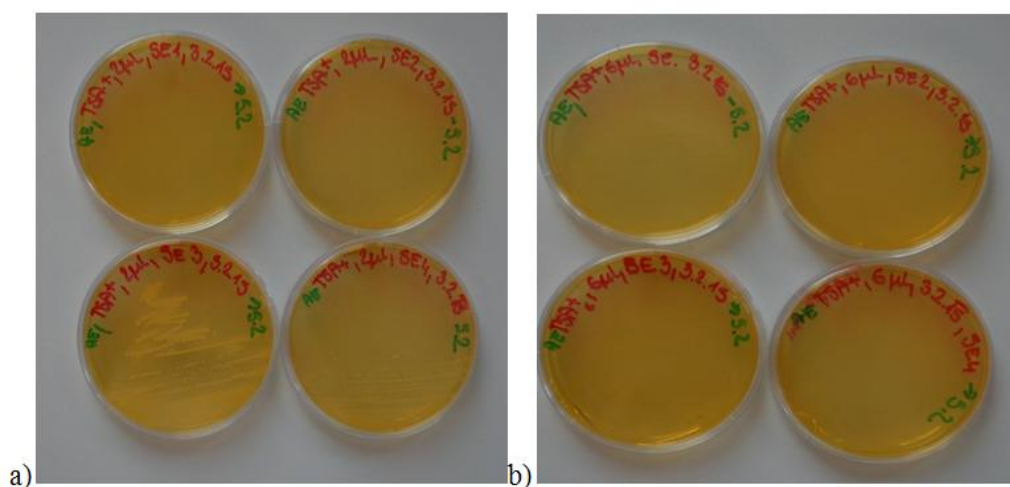
3 REZULTATI

V poglavju so predstavljeni rezultati magistrskega dela. V prvem delu so predstavljena selektivna gojišča, ki smo jih uporabljali za izolacijo bakterij iz vzorcev. V drugem delu sledi identifikacija izoliranih sevov, kjer smo naprej izolirali DNK in nato pomnoževali gen za 16S rRNK z verižno reakcijo s polimerazo. Uspešno pomnožene in očiščene pomnožke sevov smo poslali na ugotavljanje nukleotidnega zaporedja. Pridobljene sekvence smo preučili in obdelali v ustreznih programih ter izrisali filogenetsko drevo za rodova *Propionibacterium* in *Staphylococcus*. V nadaljevanju smo identificirane seve barvali po Gramu, izrisali rastno krivuljo in preverjali občutljivost bakterij na antibiotike. Tretji del je namenjen prikazu rezultatov izolacije, čiščenja in določevanja titra bakteriofagov. Sledijo jim rezultati morfološke karakterizaciji, ter nabor gostitelja.

3.1 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VZORCEV

3.1.1 Selektivna gojišča

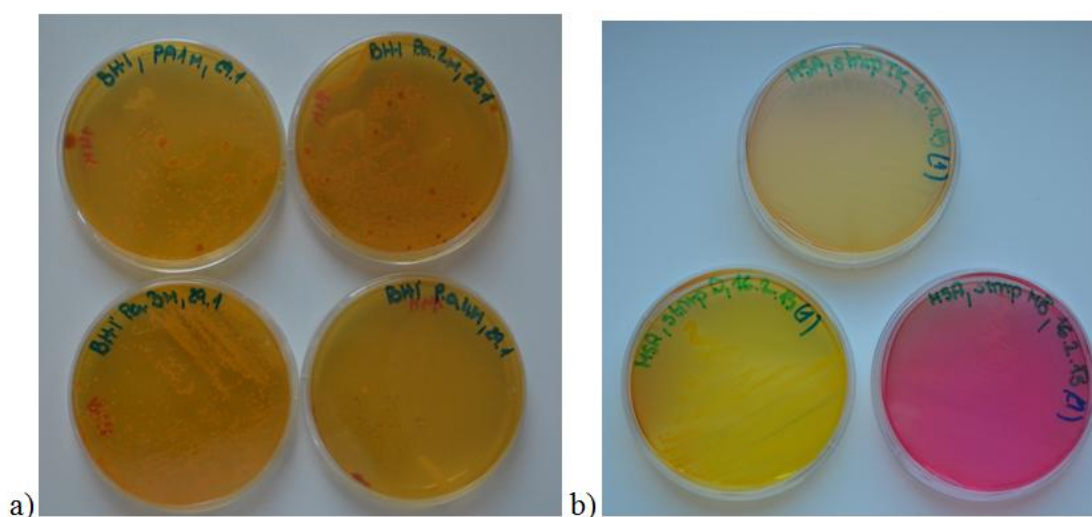
Pred izolacijo bakterij smo testirali učinkovitost delovanja antibiotika furazolidona na že identificiranih sevih *S. epidermidis* SeV1, SeV2, SeV3 in SeV4 ter sevu *P. acnes* Pa2c/430. Učinkovanje antibiotika smo preverjali kot selekcijsko sredstvo za izolacijo *P. acnes*. Pripravili smo trda gojišča TSB z različnimi koncentracijami antibiotika in opazovali rast v anaerobnih in aerobnih razmerah. Pri koncentraciji 2 $\mu\text{g/ml}$ (slika 4a) je vidna rast pri sevih SeV3 in SeV4, medtem ko pri višji koncentraciji 6 $\mu\text{g/ml}$ rasti ni (slika 4b). Za izolacijo smo uporabljali koncentracijo 2 $\mu\text{g/ml}$, za precepljanje pa 6 $\mu\text{g/ml}$.



Slika 4: Poizkus delovanja furazolidona na rast izoliranih sevov *S. epidermidis* pri koncentracijah a) 2 $\mu\text{g/ml}$ in b) 6 $\mu\text{g/ml}$ (Foto: M. Štokelj).

Na trdih gojiščih BHI z dodanim antibiotikom furazolidonom, s koncentracijo 2 µg/ml, smo iz vzorcev aken izolirali bakterijo *P. acnes* (slika 5a). Plošče smo inkubirali 7 dni pri 37 °C, anaerobno. Dalje smo precepili kolonijo od mlečno krem do roza barve, ki je bila jasno ločena od ostalih. Tako smo zagotovili, da gre za en klon oz. sev bakterije.

Na trda gojišča MSA smo nacepili vzorce trakov za čiščenje kože (slika 5b) iz katerih smo želeli izolirati bakterijo *S. epidermidis*. Barva gojišč, ki je bila sprva oranžne barve, se je po tridnevni inkubaciji pri 37 °C, aerobno, spremenila. V gojišču se nahaja indikatorsko barvilo fenol rdeče, ki vpliva na gojišče, da se obarva rumeno, če bakterija fermentira manitol oz. roza, če ga bakterija ne fermentira. Na sveže gojišče MSA smo precepljali jasno definirane kolonije krem in roza barve. Precepili smo tudi rumene kolonije, če so se pojavile le rumeno obarvane plošče.

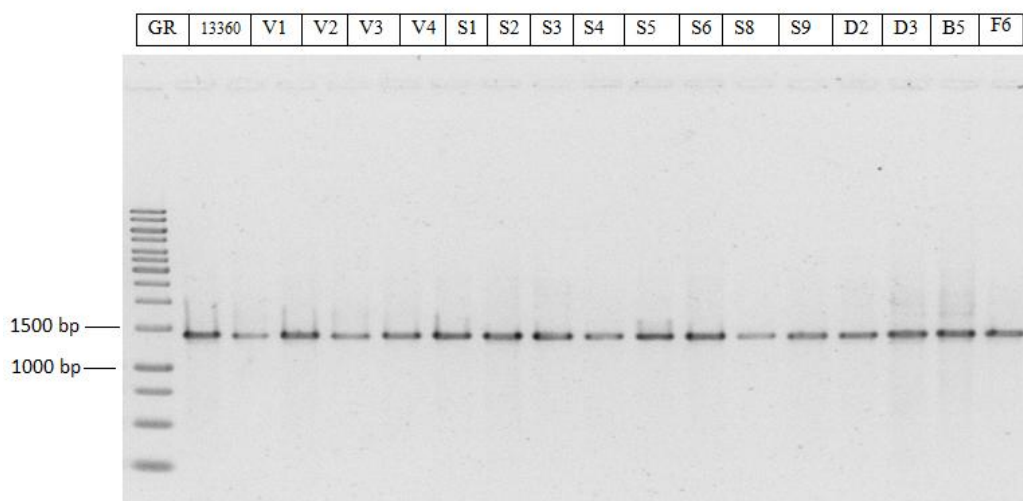


Slika 5: Rast bakterij na trdem gojišču a) BHI za izolacijo *P. acnes* iz vzorca aken in (b) MSA za izolacijo *S. epidermidis* iz vzorcev trakov za čiščenje kože (Foto: M. Štokelj).

3.2 DOLOČANJE IDENTITETE IZOLIRANIH SEVOV

3.2.1 Izolacija DNK in pomnoževanje gena za 16S rRNK z verižno polimerazo

Izolirane bakterije smo namnožili na ustreznih gojiščih in odvzeli biomaso. Iz slednje smo izolirali genomsko DNK s pomočjo seta za izolacijo in naredili PCR reakcijsko mešanico, ki smo ji dodali univerzalni par široko specifičnih začetnih oligonukleotidov, ki hibridizirata na visoko ohranjene prekrivajoče se regije gena 16S rRNK. Po končanem PCR programu smo velikost pomnožkov preverili z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 6). Pomnožke dolge 1542 bp, smo očistili in poslali na ugotavljanje nukleotidnega zaporedja.



Slika 6: Posnetek gela agarozne gelske elektroforeze s PCR pomnožki bakterij *S. epidermidis*. Oznaka GR označuje dolžinski standard, vse ostale oznake nad progami, pa imena izolatov.

3.2.2 Identifikacija in izris filogenetskega drevesa

3.2.2.1 Identificirani sevi *P. acnes* in *S. epidermidis*

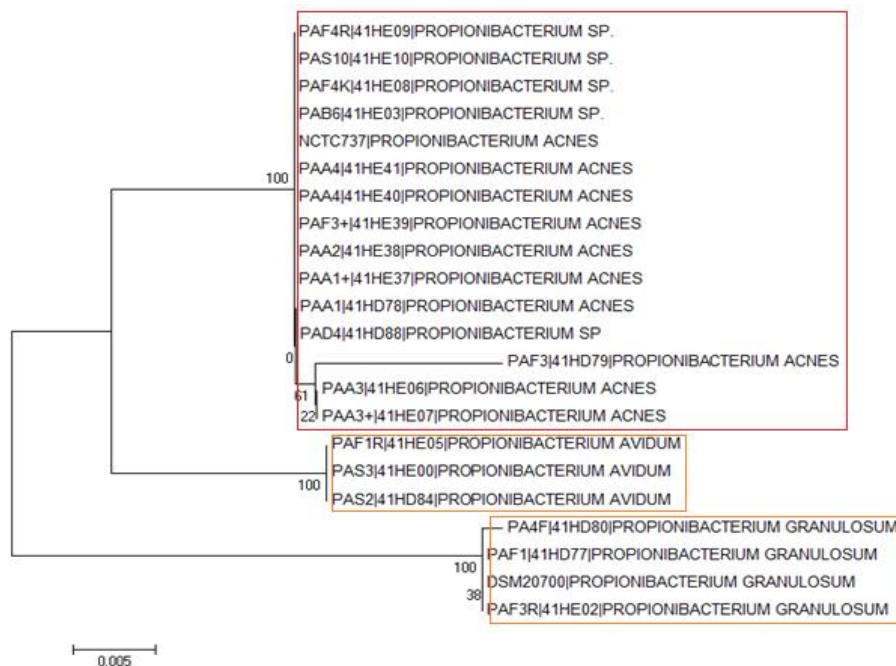
Identificirali smo 20 sevov bakterij rodu *Propionibacterium*, od tega 14 sevov *P. acnes*, ki smo jih najpogosteje izolirali iz vzorcev aken (Priloga A). Identificirali smo 20 sevov bakterij rodu *Staphylococcus*, od tega 12 sevov *S. epidermidis*, ki smo jih najpogosteje izolirali iz vzorcev trakov za čiščenje kože (Priloga B). Izolirali smo tudi 8 sevov drugih bakterijskih vrst (Priloga C). Vsi identificirani sevi rodu *Propionibacterium* in *Staphylococcus* so povzeti na filogenetskih drevesih.

3.2.2.2 Filogenetsko drevo

Filogenetska drevesa smo izrisali s programom MEGA6. V programu smo za ime sekvence obdržali poimenovanje seva, kodo sekvence ter ime vrste, ki nam ga je izpisal program BLAST. Na ta način smo lahko primerjali rezultate obeh programov za identifikacijo. V programu smo uporabili statistično metodo največje verjetnosti, filogenetski test vezanja s 500 naključnimi ponovitvami in nukleotidni substitucijski model Tamura Nei. Števila, ki so prikazana na razvejitvah drevesa, so odstotki vrednosti vezanja, ki ponazarjajo v kakšni meri sovpadajo sevi med seboj.

3.2.2.2.1 Filogenetsko drevo rodu *Propionibacterium*

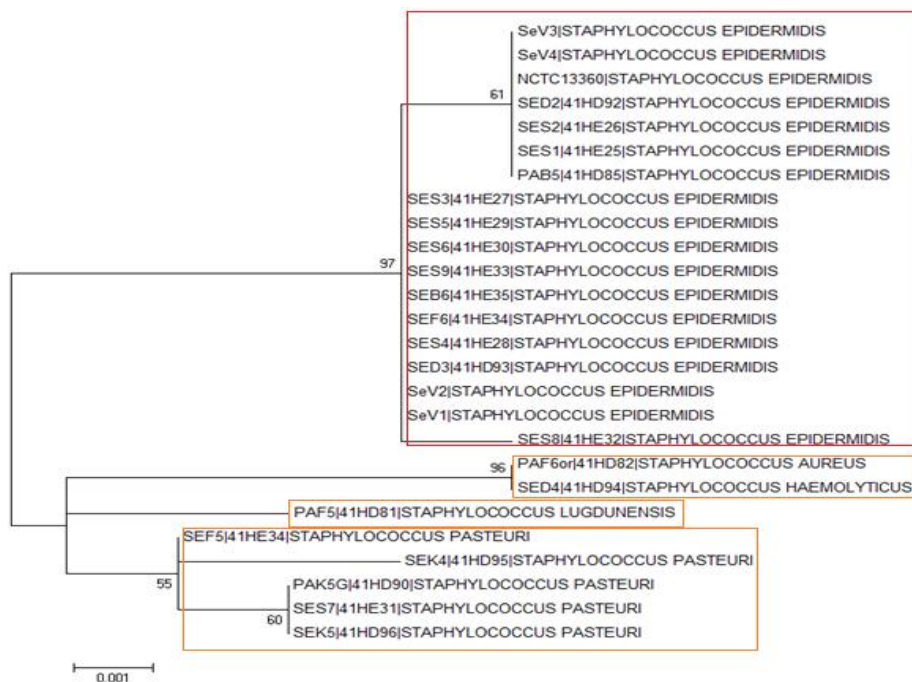
Izolirali smo seve iz treh vrst rodu *Propionibacterium* in sicer 14 sevov *P. acnes*, 3 seve *P. avidium* in 3 seve *P. granulosum* (Slika 7). Seve, ki jih je BLAST prepoznal kot *P. sp.* je program MEGA6 uvrstil v vrsto *P. acnes*, ki 100% sovpadajo med seboj.



Slika 7: Filogenetsko drevo rodu *Propionibacterium*.

3.2.2.2.2. Filogenetsko drevo rodu *Staphylococcus*

Izolirali smo seve iz petih vrst rodu *Staphylococcus* in sicer 12 sevov *S. epidermidis* s 97% sovpadanjem, 1 sev *S. aureus* in 1 sev *S. haemolyticus*, ki ju je program uvrstil skupaj z 96% sovpadanjem, 1 sev *S. lugdunensis* in 5 sevov *S. pasteurii* le s 55% sovpadanjem (Slika 8). Program MEGA6 jih je uvrstil v skupine, vendar je prikazal tudi odklone znotraj vrste.



Slika 8: Filogenetsko drevo rodu *Staphylococcus*.

3.2.3 Barvanje po Gramu

S kompletom za barvanje po Gramu (Merck Millipore) smo obarvali identificirane seve (Preglednica 5 in 6), ki smo jo prenesli iz trdih gojiš na objektno stekelce. Ko so se ta posušila, smo preparate mikroskopirali in fotografirali (Priloge D, E in F). Glede na opis so si sevi med seboj podobni. Pri *P. acnes* so pogostejše paličaste oblike, medtem ko pri *S. epidermidisu* kokalne. V obeh primerih so bili preparati Gram pozitivni.

Preglednica 5: Barvanje po Gramu za identificirane seve *P. acnes*.

Sev	Vrsta	Opis, barvanje	Sev	Vrsta	Opis, barvanje
Pa2c/430	<i>P. acnes</i>	Zelo podolgovate paličice, G+	PaNCTC/737	<i>P. acnes</i>	Podolgovate paličice, G+
PaA1+	<i>P. acnes</i>	Podolgovate paličice, G+	PaA1	<i>P. acnes</i>	Podolgovati koki, G+
PaA2+	<i>P. acnes</i>	Paličice, G+	PaA3	<i>P. acnes</i>	Podolgovati koki, G+
PaF3	<i>P. acnes</i>	Podolgovati koki, G+	PaF3+	<i>P. acnes</i>	Podolgovati koki, G+
PaA3+	<i>P. acnes</i>	Paličice, G+	PaF4g	<i>P. acnes</i>	Paličice, G+
PaA4	<i>P. acnes</i>	Podolgovati koki, G+	PaA4+	<i>P. acnes</i>	Paličice, G+
PaF4k	<i>P. acnes</i>	Paličice, G+	PaB6	<i>P. acnes</i>	Podolgovate paličice, G+
PaD4	<i>P. acnes</i>	Paličice, G+	PaS10	<i>P. acnes</i>	Podolgovate paličice, G+

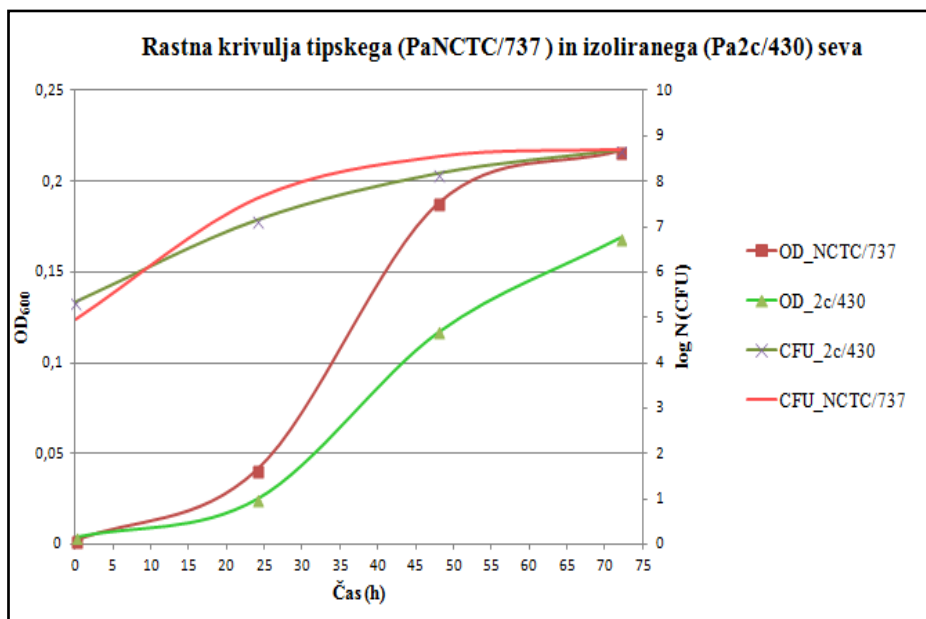
Preglednica 6: Barvanje po Gramu za identificirane seve *S. epidermidis*

Sev	Vrsta	Opis, barvanje	Sev	Vrsta	Opis, barvanje
SeV1	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeV2	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeV3	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeV4	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeI3360	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeS1	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeS2	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeS3	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeS4	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeS5	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeS6	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeS8	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeS9	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeO2	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeB5	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+	SeD2	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+
SeD3	<i>S. epidermidis</i>	Koki, G+			

3.2.4 Rastna krivulja

3.2.4.1 Rastna krivulja *P. acnes*.

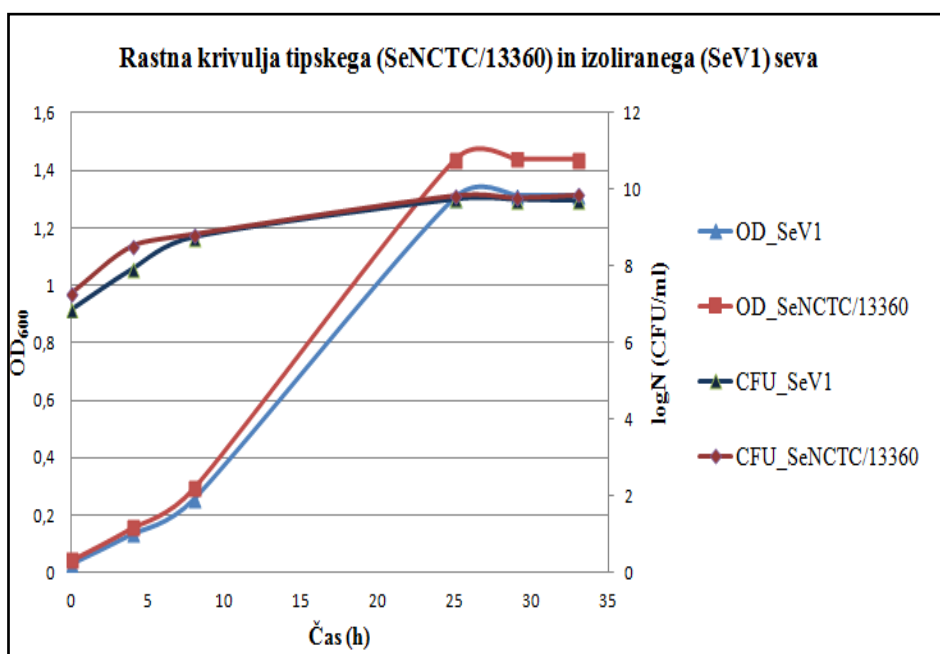
Bakterija *P. acnes* raste relativno počasi, zato smo se odločili, da njeno rast spremljamo na 24 ur, štiri dni. Tipiski sev NCTC 737 in izoliran sev 2c/430 (Slika 9) preideta iz faze prilagajanja v eksponentno fazo po približno 29 urah. Stacionarno fazo doseže tipiski sev NCTC 737 po 72 urah, ko je vrednost OD₆₀₀ 0,22, izoliran sev pa nekoliko kasneje.



Slika 9: Rastna krivulja in primerjava vrednosti parametrov optične gostote (OD_{600}) in logaritmiranih vrednosti števila kolonij (logN (CFU/ml)) med tipskim (NCTC/737) in izoliranim sevom (2c/430) *P. acnes*.

3.2.4.2 Rastna krivulja *S. epidermidis*

Rast sevov *S. epidermidis* smo spremljali trikrat dnevno, dva dneva. Oba seva SeV1 in SeNCTC/13360 preideta iz faze prilagajanja v eksponentno fazo v času 4 ur, pri vrednosti OD_{600} 0,147. V stacionarno fazo preideta po pb. 25 urah (Slika 10).



Slika 10: Rastna krivulja in primerjava vrednosti parametrov optične gostote (OD_{600}) in logaritmiranih vrednosti števila kolonij (logN (CFU/ml)) med tipskim (NCTC/13360) in izoliranim sevom (SeV1) *S. epidermidis*.

3.2.5 Občutljivost na antibiotike

Bakterije so lahko občutljive na antibiotike, kar pomeni, da antibiotik vpliva na bakterijsko rast in jo do določene mere zavira, lahko pa so odporne na antibiotike, kar pomeni, da antibiotik ne zavira bakterijske rasti (Clinical and Laboratory Standards Institute). Občutljivost bakterij na antibiotike smo preverjali z metodo diskov in merili premer lize, ter glede na premer in kriterije (Preglednica 4, str 23) uvrstili seve na občutljive in odporne.

3.2.5.1 Občutljivost sevov *P. acnes* na izbrane antibiotike

Občutljivost sevov *P. acnes* na antibiotike je pokazala, da je odpornost na antibiotike prisotna pri klindamicinu in tetraciklinu, saj je premer manjši ali enak 14 mm. Občutljivost na antibiotike je prisotna pri doksiciklinu in cefalotinu, kjer je premer večji ali enak 16 oz. 18 mm (Preglednica 7). Pri sevu PaF3 in PaA3 bakterijska travica ni zrasla, zato rezultati niso prikazani.

Preglednica 7: Občutljivost identificiranih sevov *P. acnes* na izbrane antibiotike (CLI-klindamicin, TET-tetraciklin, DOX-doksiciklin in CEP-cefalotin). Vrednosti v krepkem tisku označujejo odpornost, poševni tisk pa občutljivost.

Antibiotik \ Sev	CLI	TET	DOX	CEP
PaNCTC/737	14	7	<i>16</i>	<i>30</i>
Pa2c/430	8	6	<i>14</i>	10
PaA1	10	8	<i>14</i>	<i>25</i>
PaA1+	13	9	<i>19</i>	<i>25</i>
PaA2+	9	6	12	<i>28</i>
PaF3+	12	7	<i>16</i>	<i>25</i>
PaA3+	6	6	6	<i>36</i>
PaA4	9	8	<i>15</i>	<i>28</i>
PaA4+	12	9	<i>15</i>	<i>25</i>
PaD4gk	12	8	<i>15</i>	<i>28</i>
PaB6	10	7	<i>15</i>	<i>25</i>
PaF4k	9	6	<i>14</i>	<i>27</i>
PaF4r	14	9	<i>19</i>	<i>31</i>
PaS10	12	7	11	<i>23</i>

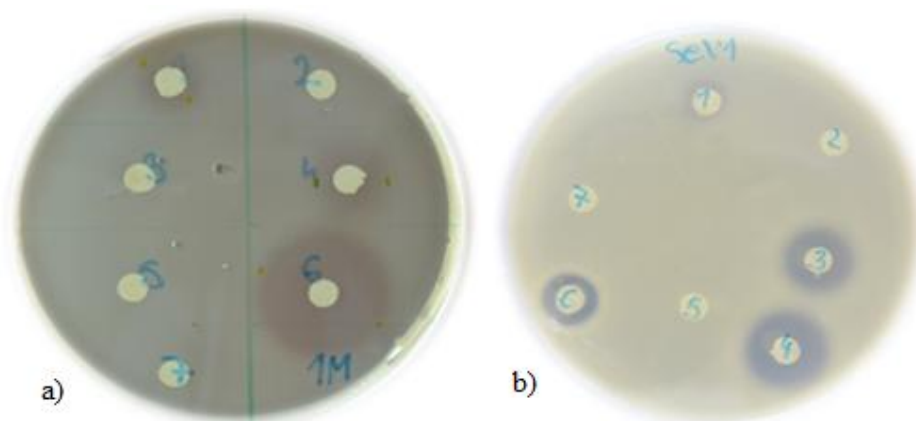
3.2.5.2 Občutljivost sevov *S. epidermidis* na izbrane antibiotike

Podobno kot pri *P. acnes* so bili sevi *S. epidermidis*, kjer smo uporabili enak kriterij (Preglednica 4), odporni na antibiotike klindamicin, tetraciklin in cefalotin, ter občutljivi na doksiciklin (Preglednica 8).

Preglednica 8: Občutljivost identificiranih sevov *S. epidermidis* na antibiotike (CLI-klindamicin, TET-tetraciklin, DOX-doksiciklin in CEP-cefalotin). Vrednosti v krepkem tisku označujejo odpornost, poševni tisk pa občutljivost.

Antibiotik \ Sev	CLI	TET	DOX	CEP
SeV1	9	12	<i>16</i>	11
SeV2	8	13	<i>18</i>	13
SeV3	6,5	<i>15</i>	<i>17</i>	8
SeV4	6	13	<i>17</i>	15
SeI3360	7	7	7	14
SeS1	7	9,5	11	6
SeS2	9	9	11	<i>18</i>
SeS3	9	14	<i>16</i>	17
SeS4	10	12	<i>15</i>	17
SeS5	8	13	<i>15</i>	10
SeS6	6	12	<i>15</i>	<i>18</i>
SeS8	6	13	<i>16</i>	<i>24</i>
SeS9	9	13	<i>15</i>	17
SeF6	8	14	<i>15</i>	16
SeB5	8	6	9	11
SeD2	6	8	10	16
SeD3	6	7	9	16

Primeri plošč z metodo diskov sta prikazani na Sliki 11, kjer vidimo bakterijsko travico in cono lize okoli diskov.



Slika 11: Primer poskusa metode diskov za test občutljivosti na antibiotike. Slika 11a) bakterijska travica *P. acnes* seva PaA1; Slika 11b) bakterijska travica *S. epidermidis* seva SeV1. Antibiotiki so označeni z naslednjimi številkami; 1-klindamicin, 2-eritromicin, 3-tetraciklin, 4- doksiciklin, 5-amoksicilin, 6-cefalotin in 7- negativna kontrola (Foto: M. Štokelj).

3.3 BAKTERIOFAGI

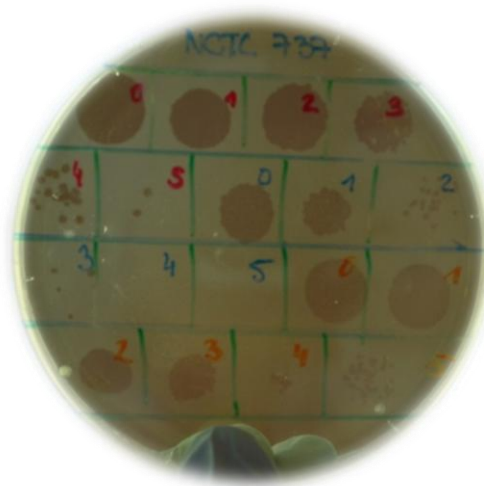
3.3.1 Izolacija bakteriofagov

Izolacija bakteriofagov je potekala z metodo nakapljanja na šestih izbranih indentificiranih sevih pri vsaki bakteriji. Vzorce smo predhodno redčili po Kochu in nanašali 10 µl posamezne redčitve na ustrezno mesto na plošči (Slika 12). Po inkubaciji smo pregledali plošče, če so se pojavile cone lize. Največkrat je bil liziran sev PaD4. Najbolj uspešni vzorci, ki so lizirali seve, so bili vzorci trakov za čiščenje kože in vzorci aken (oznake A in K), medtem ko se brisi niso izkazali za najboljše (oznake F, B) (Preglednica 9).

Preglednica 9: Izolacija bakteriofagov z metodo nakapljanja. Oznaka + ponazarja kje je vzorec liziral bakterijsko travico enega izmed 6 sevov *P. acnes*, oznaka - pa območje brez lize.

Vzorec \ Sev	Pa2c430	PaNCTC 737	PaS1	PaA1	PaD4	PaS10	Št. liziranih sevov po vzorcih
PaS1	+	+	+	+	+	+	6
PaS2	+	+	+	+	+	+	6
PaS3	+	+	+	+	+	+	6
PaS4	+	+	+	+	+	+	6
PaS5	-	-	-	-	+	-	1
PaS6	+	+	+	+	+	+	6
PaS7	+	+	+	+	+	+	6
PaS8	+	+	+	+	+	+	6
PaS9	+	+	+	+	+	+	6
PaF5	-	-	-	+	+	-	2
PaF6	-	-	-	+	+	-	2
PaF7	-	-	-	-	-	-	0
PaA1	+	+	+	+	+	+	6
PaA3	+	+	+	+	+	+	6
PaA2	+	+	+	+	+	+	6
PaA4	-	-	-	-	-	-	0
PaB5	-	-	-	-	-	-	0
PaB6	-	-	-	-	-	-	0
PaB7	-	-	-	-	-	-	0
PaD1	-	-	-	-	-	-	0
PaD1b	-	-	-	-	+	-	1
PaD2	-	-	-	+	+	-	2
PaD2b	-	-	-	-	-	-	0
PaD3	-	-	-	-	-	-	0
PaD4	-	-	-	-	-	-	0
PaD5	-	+	+	+	+	+	5
PaK1	+	+	+	+	+	+	6
PaK2	-	-	-	+	+	-	2
PaK3	-	-	-	-	+	-	1
PaK4	+	+	+	+	+	+	6
PaK5	+	-	+	+	+	+	5
PaE1	-	-	-	+	+	-	2
PaE2	-	-	-	-	-	-	0
Skupno število liziranj	14	14	15	20	23	15	Skupaj 101

Za vsak vzorec smo odvzeli le po en plak in na koncu pridobili 23 plakov pri sevih *P. acnes*. Pri sevih *S. epidermidis* so se pojavili plaki le na travici seva SeS1, z vzorcem SeS3.



Slika 12: Primer metode nakapljanja na bakterijski travici tipskega seva *P. acnes* NCTC/737 s tremi vzorci, redčeni od 0 do 10^{-5} (Foto: M. Štokelj).

3.3.2 Čiščenje in ugotavljanje števila bakteriofagov

Čiščenje plakov oz. potencialnih bakteriofagov je potekalo z metodo plakov. Po zadnjem čiščenju smo preverili koncentracijo bakteriofagov in jih poimenovali glede na to iz katerega vzorca so bili izolirani. Razpon povprečnega titra *P. acnes* plakov je bil med 3×10^6 in $2,93 \times 10^8$ PFU/ml (Priloga H). Med čiščenjem se bakteriofag iz vzorca PaD1b ni več izrazil, zato smo ga izključili iz raziskave, na drugi strani pa smo iz vzorca PaA3 izolirali dva bakteriofaga (PaA3m in PaA3j) različnih oblik. Rezultat titra bakteriofaga *S. epidermidis* je bil $2,89 \times 10^8$ PFU/ml (Priloga H).

3.3.3. Morfološka karakterizacija bakteriofagov ter nabor gostitelja

3.3.3.1 Velikost in oblika plakov

Pri bakteriofagih *P. acnes* prevladujejo predvsem veliki plaki z jasnim robom (Preglednica 10).

Edini izoliran bakteriofag *S. epidermidis* fSeS3, tvori majhne plake z motnim robom (Preglednica 10).

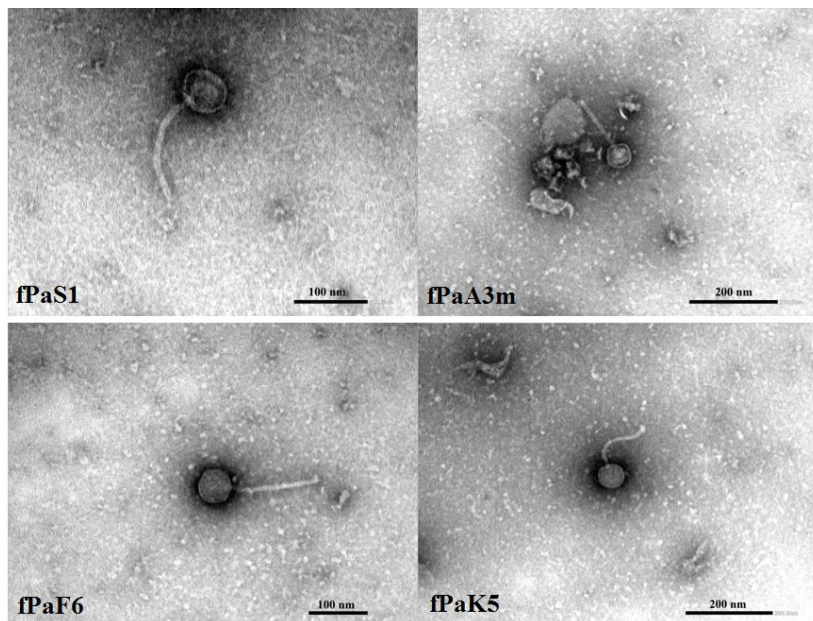
Preglednica 10: Morfološka karakterizacija plakov (majhen < 1 mm, srednje velik 1 < 2 mm in velik > 2 mm), poimenovanju bakteriofagov in vzorci iz katerih so bili izolirani bakteriofagi in bakterije.

Oznaka bakteriofaga	Vzorec in način vzorčenja	Sev za izolacijo bakteriofaga	Velikost plakov	Oblika plakov	Bakterija izolirana iz vzorca
fPaS1	PaS1-trak za čiščenje	PaA1	Srednje veliki	Jasen rob	<i>Enterococcus fecalis</i>
fPaS2	PaS2-trak za čiščenje	Pa2a430	Majhni	Zabrisan rob	<i>P. avidium</i>
fPaS3	PaS3-trak za čiščenje	Pa NCTC 737	Veliki	Jasen rob	<i>P. avidium</i>
fPaS4	PaS4-trak za čiščenje	Pa NCTC 737	Veliki	Zabrisan rob	<i>Lactobacillus paracasei</i>
fPaS5	PaS5-trak za čiščenje	PaD4	Srednje veliki	Jasen rob	
fPaS6	PaS6-trak za čiščenje	Pa NCTC 737	Veliki	Zabrisan rob	
fPaS7	PaS7-trak za čiščenje	Pa NCTC 737	Veliki	Jasen rob	
fPaS8	PaS8-trak za čiščenje	Pa2a430	Srednje veliki	Jasen rob	
fPaS9	PaS9-trak za čiščenje	Pa NCTC 737	Srednje veliki	Jasen rob	
fPaD2	PaD2-vzorec aken*	PaA1	Veliki	Zabrisan rob	
fPaD5	PaD5-vzorec aken	PaD4	Srednje veliki	Jasen rob	
fPaK1	PaK1-vzorec aken	PaD4	Srednje veliki	Zabrisan rob	
fPaK2	PaK2-vzorec aken	PaD4	Veliki	Jasen rob	
fPaK3	PaK3-vzorec aken	PaD4	Veliki	Jasen rob	
fPaK4	PaK4-vzorec aken	Pa2a430	Veliki	Jasen rob	
fPaK5	PaK5-vzorec aken	Pa2a430	Veliki	Zabrisan rob	<i>Lactococcus garvieae</i>
fPaA1	PaA1-vzorec aken	PaA1	Srednje veliki	Jasen rob	<i>P. acnes</i>
fPaA2	PaA2-vzorec aken	Pa2a430	Srednje veliki	Zabrisan rob	
fPaA3j	PaA3-vzorec aken	PaA1	Srednje veliki	Jasen rob	<i>P. acnes</i>
fPaA3m	PaA3-vzorec aken	PaA1	Srednje veliki	Zabrisan rob	
FPaF5	PaF5-bris obraza	Pa NCTC 737	Veliki	Jasen rob	<i>S. lugdunensis</i>
FPaF6	PaF6-bris obraza	Pa2a430	Veliki	Jasen rob	<i>Enterococcus fecalis</i>
fPaE1	PaE1-ognojek iz oči	PaA1	Veliki	Jasen rob	<i>Streptococcus salvariarius</i>
fSeS3	SeS3-trak za čiščenje	SeS1	Majhni	Zabrisan rob	<i>S. epidermidis</i>

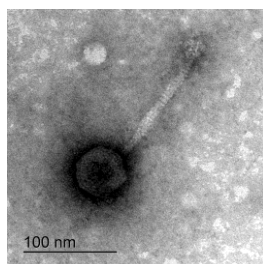
* sev osebe, ki je uporabljala antibiotik

3.3.3.2 Presevna elektronska mikroskopija

Za presevno elektronsko mikroskopijo smo pripravili preparate za naslednje bakteriofage *P. acnes*: fPaS1, fPaA3m, fPaF6 in fPaK5, izolirane iz različnih vzorcev. Preparate s bakteriofagi *P. acnes* (Slika 13) smo poslali na Inštitut za Mikrobiologijo in imunologijo (IMI), preparat s *S. epidermidis* bakteriofagom fSeS3 (Slika 14) pa smo poslali na Nacionalni inštitut za biologijo (NIB). Preparate so pregledali in nam posredovali rezultate. Glede na podatke (Preglednica 11) so bile glave bakteriofagov premera od 40 do 70 nm, repi pa so bili dolgi od 130 do 170 nm. Glede na morfologijo smo vse bakteriofage uvrstili v družino *Siphoviridae*.



Slika 13: Mikroskopski preparati izbranih bakteriofagov *P. acnes*: fPaS1 izoliran iz vzorca pridobljenega s pomočjo traka za čiščenje kože, fPaA3m izoliran iz vzorca aken, fPaF6 izoliran iz vzorca brisa obraza in fPaK5 izoliran iz vzorca aken pri kozmetičarki.



Slika 14: Mikroskopski preparat bakteriofaga *S. epidermidis* fSeS3

Preglednica 11: Morfološke karakterizacije izbranih bakteriofagov *P. acnes* in *S. epidermidis*.

Ime bakteriofaga	Premer glave	Dolžina repa
fPaS1	70 nm	170 nm
fPaA3m	60 nm	140 nm
fPaF6	50 nm	130 nm
fPaK5	40 nm	140 nm
fSeS3	50 nm	120 nm

3.3.3.3 Nabor gostitelja

Očiščene bakteriofage *P. acnes* smo redčili na titer 3×10^6 do 10^7 PFU/ml in izvedli eksperiment s pomočjo metode nakapljanja. Intenzivnost lize smo ocenjevali z vrednostmi med 0 in 4 (Preglednica 12). Najbolj uspešna, glede na jakost lize, sta bila bakteriofag fPaE1

in fPaF6, najmanj uspešen pa je bil bakteriofag fPaD2, ki je liziral le sev PaF3+. Sev PaA3+ je pokazal največjo odpornost, najmanjšo pa seva PaA4+ in PaD4.

Preglednica 12: Nabor gostitelja na identificiranih sevih *P. acnes* z očiščenimi bakteriofagi. Intenzivnost lize smo ocenjevali z vrednostmi med 0 in 4, pri čemer je vrednost 0 pomenila, da bakteriofag sev ni liziral, 1 pojavili so se posamezni plaki, 2 veliko število še razvidnih plakov, 3 moten plak in 4 popolna liza.

Sev Bakterio fag	2c4 30	737	S1 0	B6	A1	A1 +	A2	F3	F3 +	A3	A3 +	A4	A4 +	F4 k	F4r	D4
S1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
S2	0	2	2	1	2	1	3	0	2	0	0	2	2	2	2	2
S3	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
S4	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
S5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
S6	2	2	2	0	2	1	3	0	1	0	0	2	2	2	1	2
S7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S8	1	2	2	1	2	2	1	0	1	0	0	1	1	2	2	2
S9	2	2	2	0	2	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
D2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
D5	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1
K1	2	2	2	2	3	2	2	0	2	0	0	2	2	2	2	2
K2	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K3	2	2	2	0	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
K4	2	2	2	0	3	2	2	0	2	0	0	2	2	2	2	2
K5	2	2	2	1	3	2	2	1	2	1	0	2	2	3	2	2
A2	1	1	2	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	2
A1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
A3j	2	2	2	0	1	2	2	3	2	2	3	0	2	2	2	2
A3m	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1	3	1	1	1	1	1
F5	2	3	3	2	3	2	3	0	3	0	0	2	3	3	3	3
F6	3	4	4	3	4	3	4	0	4	0	0	3	4	4	4	4
E1	2	3	3	2	3	3	3	2	3	4	3	3	3	3	3	3

Bakteriofag *S. epidermidis* fSeS3 je liziral le štiri seve od sedemnajstih in sicer seve SeS1, SeS3, SeS6 in SeS9 z vrednostjo lize 1 ali 2 (Preglednica 13).

Preglednica 13: Nabor gostitelja na identificiranih sevih *S. epidermidis* z očiščenim bakteriofagom fSeS3. Intenzivnost lize smo ocenjevali z vrednostmi med 0 in 4, pri čemer je vrednost 0 pomenila, da bakteriofag sev ni liziral, 1 pojavili so se posamezni plaki, 2 veliko število še razvidnih plakov, 3 moten plak in 4 popolna liza.

Sev Bakterio fag	N CT C	V1	V2	V3	V4	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S8	S9	O6	B5	D2	D3
S3	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	2	0	0	0	0

4 DISKUSIJA

4.1 IZOLACIJA BAKTERIJ IZ VZORCEV IN IZBIRA SELEKTIVNIH GOJIŠČ

V nalogi smo izolirali bakterije iz vzorcev, ki smo jih pridobili na tri načine: brisi kože obraza in hrbta, vzorci aken ter vzorci pridobljeni s trakovi za čiščenje kože. Na ta način smo poskušali zajeti habitat, kjer se nahajata *P. acnes* in *S. epidermidis* (Patrick in McDowell 2009; Schleifer in Bell 2011)

Na začetku naloge smo si zastavili hipotezo, da je za uspešno izolacijo bakterijskih vrst *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis* pomembno izbrati ustrezno selektivno gojišče.

Pred samo izolacijo bakterij iz vzorcev smo kot selekcijsko sredstvo za izolacijo preizkusili delovanje antibiotika furazolidona. Je sintetični, nitrofuran antibiotik, ki je znan po tem, da zavira rast stafilokokov. Največkrat se v literaturi pojavi koncentracija 2 µg/ml furazolidona, omenjajo pa se tudi naslednje vrednosti: 4%, 2 mg/ml, 8 mg/l, in 6 µg/ml (Marino in Stoughton 1982; Ross in sod. 2003; Lomholt in Kilian 2014). Marino in Stoughton (1982), ki sta preučevala delovanje antibiotika navajata, da je optimalna uporaba med 5 µg/ml in 20 µg/ml, pri koncentraciji 60 µg/ml pa antibiotik zavira rast tudi *P. acnes*. Odločili smo se, da poskusimo učinkovitost na štirih identificiranih sevih *S. epidermidis* (Slika 4) in identificiranem sevu *P. acnes* Pa2c/430 z dvema koncentracijama: 2 in 6 µg/ml. Pri koncentraciji 2 µg/ml je bila še vidna rast sevov *S. epidermidis* SeV3 in SeV4, medtem ko se bakterije pri višji koncentraciji antibiotika niso namnoževale. Rast *P. acnes* je bila prisotna pri obeh koncentracijah, pri višji koncentraciji malo manj močna. Ravno zaradi tega smo se odločili, da pri izolaciji uporabljamo koncentracijo 2 µg/ml in pri nadaljnjem precepljanju oz. čiščenju uporabimo večjo koncentracijo 6 µg/ml. Tako smo poskušali zagotoviti, da bi se potencialna bakterija *P. acnes* ohranila, hkrati pa bi pri višji koncentraciji izključili, da gre za vrsto stafilokoka. Pri ploščah smo morali paziti, da so bile čimbolj sveže. Furazolidon je dušikova spojina, ki se razgradi na alkalne spojine, zaradi česar postane antibiotik sčasoma strupen za *P. acnes* (Marino in Stoughton 1982), kar se je izkazalo tudi pri čiščenju sevov.

Gojišče MSA smo uporabljali pri izolaciji *S. epidermidis*. Gojišče se je pokazalo za učinkovito, saj smo lahko že vizualno videli ali je bakterija manitol pozitivna ali negativna. Barvni preskok iz začetne oranžne v roza ali rumeno barvo je omogočilo indikatorsko barvilo fenol rdeče. Poleg tega je bila v gojišču tudi velika koncentracija soli, ki jo lahko *S. epidermidis* prenaša. Zato smo morali biti previdni tudi pri času inkubacije, saj je sol po daljši inkubaciji kristalizirala. V drugih raziskavah sicer nismo zasledili uporabe gojišča MSA za izolacijo, da bi primerjali rezultate izolacije.

4.2 DOLOČANJE IDENTITETE IZOLIRANIH SEVOV

4.2.1 Identifikacija, izris filogenetskega drevesa in barvanje po Gramu

Izolirali in identificirali smo 20 sevov bakterij rodu *Propionibacterium* (Prilogi A) in 20 sevov bakterij rodu *Staphylococcus*. Izolirali smo tudi 8 sevov drugih bakterijskih vrst (Priloga C). Vključno z začetnimi izoliranimi in tipskimi sevi smo imeli za nadaljnje poizkuse 16 bakterijskih sevov *P. acnes*, 17 sevov *S. epidermidis* ter 22 sevov drugih vrst bakterij. Skupno smo izolirali 14 vrst bakterij.

Glede na filogenetsko drevo rodu *Propionibacterium* (Slika 7) smo izolirali tri vrste iz rodu: *P. acnes*, *P. avidium* in *P. granulosum*. Da smo iz vzorcev izolirali druge vrste rodu *Propionibacterium*, ni presenetljivo, saj imajo podobne življenjske zahteve in habitat. Pogosto se vse omenjajo pri izolaciji bakterij iz aken, nekateri pa celo menijo, da je za močne akne odgovorna *P. granulosum* (Chiller in sod. 2001; Ross in sod. 2003). Slednja ima aktivnejšo lipazo kot *P. acnes*, njene kolonije pa so v primerjavi s slednjo bolj bele in večje, številčno pa je precej manj pogosta. *P. avidium* je najbolj temperaturno odporna predstavica rodu *Propionibacterium*, najpogosteje pa jo najdemo v pilosebacealnih enotah bolj vlažnih delov kože, kot so pazduha, dimlje in perianalno območje (Patrick in McDowell 2009).

Glede na filogenetsko drevo rodu *Staphylococcus* (Slika 8), smo izolirali pet vrst iz rodu; *S. epidermidis*, *S. lugdunensis*, *S. pasteurii*, *S. aureus* in *S. haemolyticus*. Za stafilokoke velja, da jih lahko pogosto najdemo na koži, kožnih žlezah in sluznici toplokrvnih živali (Schleifer in Bell 2011). *S. aureus* je verjetno najbolj znana predstavica stafilokokov, saj kot patogen povzroča številne probleme v zdravstvu, vendar jo pri zdravih ljudeh težje izoliramo. Je koagulaza pozitivna bakterija, medtem ko je druga najpogosteje izolirana stafilokokna bakterija, *S. haemolyticus*, koagulaza negativna. Za obe velja, da lahko fermentirata manitol (Schleifer in Bell 2011), zato so se gojišča MSA obarvala rumeno. Zanimivo je, da ju je program uvrstil skupaj, čeprav imata bakteriji skupen le podoben profil maščobnih kislin (Schleifer in Bell 2011). Podoben problem imajo raziskovalci z razlikovanjem bakterij *Salmonella*, *Shigella* in *Escherichia coli*, kjer 16S rRNK ne poda dovolj informacij za razlikovanje (Fukushima in sod. 2002). Sekvenca 16S rRNK v našem primeru ne zadošča. Drugi del razvejitve prikazuje *S. lugdunensis*, ki je koagulaza negativen stafilokok, ki se obnaša podobno kot *S. aureus*, saj lahko veže koagulazo, vendar ne proizvaja proste koagulaze. Kolonije so rumene do bež barve, bakterija pa pretvarja manitol (Babu in Oropello 2011), zato se tudi pri njej gojišča MSA obarvala rumeno. Nazadnje nam ostane še *S. pasteurii*, katere skupina je prikazala le 55% vezavo. *S. pasteurii* je koagulaza pozitiven stafilokok in je podoben vrsti *S. warneri*. Ima svetle kolonije, sicer pa ne pretvarja manitola (Schleifer in Bell 2011).

Vsi identificirani sevi bakterij *P. acnes* (Preglednica 5, Priloga D) in *S. epidermidis* (Preglednica 6, Priloga E) so bili Gram pozitivni. Morfologija celic in kolonij je ustrezala opisom iz literature (Patrick in McDowell 2009; Schleifer in Bell 2011). Pri *P. acnes* so manjše razlike pri morfologiji celic in kolonij, kar lahko pripišemo temu, da je morfologija povezana z določenim biotipom bakterije (Rollason in sod. 2013).

Na začetku naloge smo si zadali kar nekaj hipotez vezanih na identifikacijo bakterij. Prva takšna hipoteza se glasi: Iz vzorcev kože bomo najpogosteje izolirali *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*. Iz skupno 48 vzorcev smo izolirali 14 sevov *P. acnes* in 12 sevov *S. epidermidis*, torej lahko hipotezo potrdimo.

Naslednja hipoteza se je glasila: Iz vzorcev kože bomo izolirali tudi druge vrste bakterij iz rodov *Propionibacterium* in *Staphylococcus*. Iz filogenetskih dreves lahko potrdimo tudi to hipotezo, saj smo pri rodu *Propionibacterium*, poleg *P. acnes*, izolirali še dve vrsti, pri rodu *Staphylococcus*, pa poleg *S. epidermidis*, štiri vrste.

Peta hipoteza se je navezovala na *S. epidermidis*: Pri vzorcih kože oseb z izrazitim pojavom aken je izolacija *Staphylococcus epidermidis* uspešnejša. Izmed 20 identificiranih sevov rodu *Staphylococcus* je bilo 6 vzorcev od oseb z močnejšim pojavljanjem aken, od tega smo iz 4 vzorcev izolirali *S. epidermidis*. Hipotezo bi lahko bolj zanesljivo potrdili, če bi se osredotočili le na eno vrsto vzorca, in sicer bi morali imeti zgolj vzorce oseb z močno izraženimi aknami, ki bi jo primerjali s kontrolno skupino vzorcev oseb brez aken. *S. epidermidis* je namreč ena izmed najpogosteje izoliranih bakterij, ki se pojavlja tudi na koži zdravih posameznikov in je del normalne flore kože (Cogen in sod. 2008).

Predvidevamo, da lahko na izolacijo vpliva sam način vzorčenja, transport oz. pogoji med njim in morda lahko s tem razložimo izolacijo drugih bakterijskih rodov iz vzorcev *P. acnes* (Priloga C), kar bi bilo zanimivo preveriti. Za večjo gotovost in bolj natančno statistično obravnavo rezultatov izolacije, pa bi potrebovali večje število identificiranih sevov.

4.2.2 Rastna krivulja

Tipski sev PaNCTC/737 je prej prešel v stacionarno fazo kot sev Pa2c/430 (Slika 9). Pri bakterijski travici smo se odločili, da uporabimo bakterijsko kulturo z vrednostjo OD₆₀₀ 0,22, vendar se je izkazal za boljšega višji OD₆₀₀ 0,25 (Ferrari in sod. 2007). V primerjavi z rastno krivuljo v študiji Lood in Collin (2012), sta seva stacionarno fazo dosegla 12 ur prej, v času 60 ur, vendar so uporabljali gojišče BHI brez kisika.

Po drugi strani sta si bila izolirani (SeV1) in tipski (SeNCTC/13660) sev *S. epidermidis* veliko bolj podobna (Slika 10). V zgodnjo eksponentno fazo sta prešla po približno 4 urah, v stacionarno pa po 25 urah. Podobno rastno krivuljo so izrisali Madhusoodanan in sod. (2011), ter Zhu in sod. (2010), pri katerih so sevi eksponentno fazo dosegli v podobnem času in OD_{600} , vendar se podatki o času in vrednosti stacionarne faze med seboj razlikujejo.

4.2.3 Občutljivost na antibiotike

V analizi občutljivosti na antibiotike smo uporabili vse identificirane seve *P. acnes* in *S. epidermidis*. Najprej smo vzgojili ustrezno bakterijsko kulturo, ki smo jo uporabili za izdelavo bakterijske travice. Nanjo smo nanесли sterilne diske (filter papir, premer 6 mm) na katere je bila predhodno nanescena ustrezna koncentracija raztopine antibiotika (Preglednica 4, str 23). Plošče smo nato inkubirali 24 ur in izmerili premer (mm) cone lize okoli diska.

Metoda diskov za testiranje občutljivosti sevov *P. acnes* na izbrane antibiotike (Preglednica 7) je pokazala, da so sevi odporni na klindamicin in tetraciklin. Klindamicin, predstavnik makrolidov, je pri zdravljenju aken že dolgo v uporabi. V študijah (Ross in sod. 2003; Webster in Graber 2008; Zandi in sod. 2011) ugotavljajo, da je odpornost *P. acnes* na ta antibiotik v zadnjih dvajsetih letih vedno večji in dosega nivo odpornosti od 50 do 70% sevov. Tetraciklin je na drugi strani predstavnik ciklinov, za katere velja, da ne povzročajo tako velike odpornosti kot makrolidi, vendar so v zadnjih 30 letih zabeležili porast tudi pri tem antibiotiku (Webster in Graber 2008). Sevi so pokazali občutljivost na doksiciklin in cefalotin. Doksiciklin je kot tetraciklin predstavnik ciklinov, zanj pa velja fototoksičnost oz. občutljivost, zato ga v poletnih mesecih v Južni Evropi manj pogosto predpisujejo, po drugi strani pa je primeren za bolnike z ledvično okvaro (Dréno in sod. 2004). Odpornost na antibiotik ni bila zaznana (Zandi in sod. 2011), zato antibiotik predlagajo za prvo izbiro pri zdravljenju aken (Dréno in sod. 2004). Cefalotin je antibiotik prve generacije cefalosporin antibiotikov. Pri zdravljenju aken je že pokazal učinkovitost, vendar se ga uporablja tudi za zdravljenje drugih infekcijskih bolezni, zato njegovo uporabo odsvetujejo. Uporablja se zgolj v primerih, ko ostali antibiotiki niso uspešni ali ko gre za Gram negativne akne (Amin in sod. 2007; Del Rosso in Kim 2009).

Za *S. epidermidis* in tudi druge bakterijske vrste velja, da lahko pri zdravljenju aken z antibiotiki, ki naj bi v osnovi delovali na *P. acnes*, razvijejo odpornost na te antibiotike (Dhillon in Varshney 2013). Metoda diskov za ugotavljanje občutljivosti sevov *S. epidermidis* na izbrane antibiotike (Preglednica 8) je pokazala, da so sevi odporni na klindamicin, tetraciklin in cefalotin, ter občutljivi na doksiciklin. Pri klindamicinu so poročali, da je odpornost 30% (Nishijima in sod. 2000), zato predlagajo, uporabo antibiotika v kombinaciji z rifamcinom (Queck in Otto 2008). Tetraciklin je že dolgo v uporabi pri zdravljenju

stafilokoknih okužb, zato ni presenetljivo da se je pokazala odpornost. Odpornost pri zdravljenju aken z uporabo tetraciklina je lahko kar 87,5% (Noyon in sod. 1998). Pri doksiciklinu je odpornost lahko 41% za izolate iz različnih področij (Haquen on sod. 2009). Za zdravljenje s cefalotinom nismo našli novejših študij, vendar domnevamo, da velja zanj enaka trditev, kot je napisana pri diskusiji o cefalotinu pri *P. acnes*.

V nalogi smo na začetku podali tudi hipotezo na temo antibiotikov: Bakteriji *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis* bosta pokazali različno občutljivost na antibiotike v odvisnosti od predhodne terapije. Identificirani sevi *P. acnes*, ki smo jih uspeli izolirati niso bili od oseb, ki bi v času odvzema uporabljali antibiotike. Sev PaB6 je sicer pripadal vzorcu osebe, ki je bila v času odvzema pol leta brez antibiotika, vendar glede na rezultat ni odstopal od ostalih sevov. Pri sevih *S. epidermidis* pa je vzorec osebe, iz katere smo izolirali sev SeD2, uporabljala antibiotik doksiciklin, na katerega je test difuzije diskov pokazal odpornost. V tem primeru torej hipoteze ne moremo potrditi, saj so se sevi odzvali podobno, ne glede na predhodno terapijo. Študije, ki se sicer ukvarjajo z ugotavljanjem občutljivosti na antibiotike zajemajo veliko število sevov, mi pa smo imeli manjši skupini. Glede na to bi morali izolirati veliko več sevov in preveriti občutljivost na antibiotike, da bi lahko prišli do konkretnjših zaključkov.

4.3 BAKTERIOFAGI

4.3.1 Izolacija bakteriofagov

Izolacija bakteriofagov je potekala z metodo nakapljanja na šestih izbranih indentificiranih sevih *P. acnes* in *S. epidermidis*, s pomočjo vzorcev iz katerih so bili slednji tudi izolirani. Med izolacijo smo bili pozorni tudi na to ali so bili plaki ob večji redčitvi bolj definirani, s čimer smo izključili, da bi bili slednji rezultat delovanja bakteriocinov.

Za vsak vzorec smo odvzeli le po en plak in na koncu pridobili 23 plakov. Izmed 6 gostiteljskih sevov, ki smo jih izbrali za izolacijo bakteriofagov je bil največkrat liziran sev PaD4. Liziran je bil s strani vseh vzorcev, katerih plaki so bili v nadaljevanju tudi očiščeni. Najbolj uspešni vzorci, ki so lizirali seve, so bili vzorci trakov za čiščenje kože in aken (oznake A in K), medtem ko se brisi kože niso izkazali za najboljše (oznake F, B) (Preglednica 9). Pri *P. acnes* obstajajo študije, ki so uporabljale podobno metodo posameznega vzorčenja (Ross in sod. 2003; Marinelli in sod. 2012), vendar ne moremo primerjati uspešnosti med njimi, saj niso bile uporabljene hkrati.

Pri sevih *S. epidermidis* so se pojavili plaki le na travici seva SeS1, z vzorcem SeS3. Metodo plakov smo s 25 vzorci in 6 sevi ponovili dvakrat, vendar je bil kljub izbiri čim bolj različnih sevov, rezultat enak. Razlog lahko prepišemo temu, da so do sedaj iz kože izolirali le lizogene

bakteriofage, ki pa jih je potrebno vzpodbuditi, da vstopijo v litični cikelj in se izrazijo (Gutiérrez in sod. 2010). V literaturi nismo zasledili, da bi uporabili tovrstno vzorčenje.

Zadnja hipoteza v nalogi se je glasila: V vzorcih kože bodo prisotni bakteriofagi bakterij *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*. Hipotezo lahko potrdimo, predvsem pa to velja za bakteriofage *P. acnes*. Zanimivo je, da je bila večja uspešnosti pri izolaciji bakteriofagov *P. acnes* kot pa pri *S. epidermidisu*, kar pa lahko prepisemo sami naravi bakteriofaga. Za dva vzorca, PaA1 in PaA3, velja, da nam je uspelo iz njih izolirati tako bakterijo kot bakteriofag, v drugih vzorcih pa smo izolirali druge bakterijske vrste oz. te še niso bile potrjene (Preglednica 10). Vzorec PaD2 smo pridobili od osebe, ki je uporabljala antibiotik in je zanimivo, da nam je uspelo izolirati bakteriofag, zato bo potrebno poskusiti izolirati še bakterijo. Na drugi strani pa smo uspeli iz vzorcev PaA1 in PaA3 izolirati tako bakterijo kot bakteriofag. Razlog za to lahko prepisemo okoliščinam ravnanja z vzorcema, saj sta bila oba po odvzemu takoj procesirana.

Iz vzorca SeS3 nam je uspelo izolirati bakteriofag *S. epidermidis* in bakterijo (Preglednica 10). Razlog za to bi lahko bil deloma podoben kot pri *P. acnes*, in sicer je bil vzorec po odvzemu takoj procesiran.

4.3.2 Čiščenje in ugotavljanje števila bakteriofagov

Čiščenje plakov je potekalo z metodo plakov. Po zadnjem čiščenju smo preverili koncentracijo očiščenih bakteriofagov (PFU/ml). Med čiščenjem se plak vzorca PaD1b ni več izrazil, zato smo ga izključili iz nadaljnje obravnave, razlog za to pa lahko pripišemo latentni naravi bakteriofaga. Razpon povprečnega titra *P. acnes* plakov se giblje med 3×10^6 in $2,93 \times 10^8$ PFU/ml. Medtem je rezultat titra *S. epidermidis* bakteriofaga $2,89 \times 10^8$ PFU/ml. Nekateri titri so bili sicer majhni, vendar dovolj dobri, da smo lahko nadaljevali nalogo.

4.3.3 Morfološka karakterizacija bakteriofagov

4.3.3.1 Presevna elektronska mikroskopija

Za presevno elektronsko mikroskopijo smo pripraviti preparate za bakteriofage obeh bakterijskih vrst. Ker je postopek časovno zamuden in drag smo pripravili naslednje preparate bakteriofagov *P. acnes*: fPaS1, fPaA3m, fPaF6 in fPaK5 in bakteriofag *S. epidermidis* fSeS3. Glede na morfologijo jih lahko uvrstimo v družino *Siphoviridae*. Morfologija je primerljiva drugim raziskavam (Daniel in sod. 2007; Brüggemann in Lood 2013).

4.3.3.2 Nabor gostitelja

Na koncu naloge nas je zanimalo še koliko sevov in kako močno so sposobni lizirati očiščeni bakteriofagi. Vse bakteriofage smo redčili na podoben titer (3×10^6 do 10^7 PFU/ml). Kot pri metodi nakapljanja smo pripravljeno redčitev nanašali na bakterijsko travico posameznega seva. Po inkubaciji smo plake ocenili med 0 in 4. Pri bakteriofagih *P. acnes* (Preglednica 12) sta bila najbolj uspešna, glede na jakost lize, bakteriofaga fPaF6 in fPaE1. Bakteriofag fPaF6, izoliran iz vzorca osebe z izrazitimi aknami, je najmočnejše liziral seve. V vzorcu smo sicer izolirali bakterijo *Enterococcus fecalis*, pri kateri so Kang in sod. (2009) odkrili, da njeni bakteriocini vplivajo na rast *P. acnes* in bi jih lahko uporabljali pri zdravljenju aken. Drugi najmočnejši bakteriofag fPaE1 je bil izoliran iz očesnega ognojka, kar sprva ni bilo območje preiskovanja, zato bi bilo zanimivo preučiti njegovo genetiko in jo primerjati s bakteriofagi izoliranimi iz aken. Po drugi strani pa smo lahko med odvzemom brisa zajeli tudi območje kože. Najmanj uspešen bakteriofag je bil bakteriofag fPaD2 izoliran iz vzorca osebe, ki je v času odvzema uporabljala antibiotik. Razlog bi bilo mogoče prepisati učinkovitosti antibiotika na bakterijo in s tem posledično na bakteriofage, kar pa bi bilo potrebno še preučiti s poskusom izolacije bakterije iz vzorca. Na drugi strani pa je sev PaA3+ pokazal največjo odpornost na očiščene bakteriofage, najmanjšo pa seva PaA4+ in PaD4. Vsi so bili izolirani iz vzorca aken. Sev PaD4 smo uporabili tudi pri izolaciji bakteriofagov iz vzorcev in je bil liziran s strani vseh izoliranih bakteriofagov. Za dodatne pojasnitve bi bilo mogoče narediti še genetske preiskave bakteriofagov in umestiti bakterijske seve v biotipe. Če gledamo celotne rezultate pri naboru gostitelja bakteriofagov *P. acne*, so ti uspešni. Nekateri avtorji (Marinelli in sod. 2012) razlog za to pripisujejo majhni genetski razliki med samimi bakteriofagi.

Edini bakteriofag *S. epidermidis* fSeS3 pa je po drugi strani uspel lizirati le 4 seve: SeS1, SeS3, SeS6 in SeS9. Za vse velja, da so bili izolirani iz vzorcev trakov za čiščenje kože in predstavljajo vzorce komedonskih aken, vse osebe pa so imele malo izražene akne (Priloga B). Raziskave za izolacijo bakteriofagov in bakterij *S. epidermidis* s pomočjo trakov za čiščenje kože še ni bilo oz. je nismo zasledili.

5 SKLEP

Prvo hipotezo, da je za uspešno izolacijo bakterijskih vrst *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis* pomembno izbrati ustrezno selektivno gojišče, lahko potrdimo. Izbira gojišč, ki smo jih pred uporabo dodatno preizkusili, se je izkazala za dokaj uspešno, predvsem gojišče MSA za izolacijo bakterije *S. epidermidis*.

Zadali smo si kar nekaj hipotez vezanih na identifikacijo bakterij. Prva takšna hipoteza se je glasila: Iz vzorcev kože bomo najpogosteje izolirali *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*. Iz skupno 48 vzorcev smo izolirali 14 sevov *P. acnes* in 12 sevov *S. epidermidis*, torej lahko hipotezo potrdimo. Naslednja hipoteza se je glasila: Iz vzorcev kože bomo izolirali tudi druge vrste bakterij iz rodov *Propionibacterium* in *Staphylococcus*. Iz rezultatov filogenije lahko potrdimo tudi to hipotezo, saj smo pri rodu *Propionibacterium*, poleg *P. acnes*, izolirali še dve vrsti, pri rodu *Staphylococcus*, pa poleg *S. epidermidis*, štiri vrste. Peta hipoteza se je navezovala na *S. epidermidis*: Pri vzorcih kože oseb z izrazitim pojavom aken je izolacija *Staphylococcus epidermidis* uspešnejša. Izmed 20 identificiranih sevov rodu *Staphylococcus* je bilo 6 vzorcev od oseb z močnejšim pojavljanjem aken, od tega smo iz 4 vzorcev izolirali *S. epidermidis*. Hipotezo bi lahko potrdili z večjo gotovostjo, če bi se osredotočili le na vzorce oseb z močno izraženimi aknami, ki bi jih primerjali s kontrolno skupino vzorcev brez aken in bi jih tako lahko ustrezno statistično testirali. *S. epidermidis* je namreč ena izmed najpogosteje izoliranih bakterij, ki se pojavlja tudi na koži zdravih posameznikov ter je del normalne flore kože. V nalogi smo postavili tudi hipotezo na temo antibiotikov: Bakteriji *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis* bosta pokazali različno občutljivost na antibiotike v odvisnosti od predhodne terapije. Identificirani sevi *P. acnes*, ki smo jih uspeli izolirati, niso bili od oseb, ki bi v času odvzema uporabljale antibiotike. Sev PaB6 je sicer pripadal vzorcu osebe, ki je bila v času odvzema pol leta brez antibiotika, vendar glede na rezultat ni odstopal od ostalih sevov. Pri *S. epidermidis* sevih pa je oseba, iz katere vzorca smo izolirali sev SeD2, uporabljala antibiotik doksiciklin, na katerega je naš test pokazal odpornost. V tem primeru torej hipoteze ne moremo potrditi, saj so se sevi odzvali podobno ne glede na predhodno terapijo. Za boljše rezultate bi bilo potrebno pridobiti veliko večje število sevov.

Zadnja hipoteza v nalogi se je glasila: V vzorcih kože bodo prisotni bakteriofagi bakterij *Propionibacterium acnes* in *Staphylococcus epidermidis*. Hipotezo lahko potrdimo. Ta velja predvsem za bakteriofage *P. acnes*, kar pa lahko prepišemo sami naravi bakteriofaga.

Cilj naloge je bil vzpostaviti metodologijo, kar nam je uspelo, hkrati pa smo ugotovili kje bi bila potrebna dodatna pozornost za boljše rezultate. V prvi vrsti bi bilo treba pridobiti večje število vzorcev, uvesti kontrolno skupino vzorcev oseb brez aken, narediti ustrezne ponovitve, preveriti vpliv transporta in dodati podrobnejše genetske preiskave bakterij in bakteriofagov.

6 LITERATURA

Alharithy R. 2011. Adolescent's acne: Scarring inside out! *Journal of Saudi Society of Dermatology & Dermatologic Surgery* 15: 43-46.

Alexeyev O.A in Jahns A.C. 2012. Sampling and detection of skin *Propionibacterium acnes*. Current status. *Anaerobe* 18:479-483.

Amin K., Riddle C.C., Aires J. D. in Schweiger S. E. 2007. Common and Alternative Oral Antibiotic Therapies for Acne Vulgaris: A Review. *Journal of Drugs in Dermatology* 9: 873-880.

Aubin G.G., Potillo M.E., Trampuz A. in Corvec S. *Propionibacterium acnes*, an emerging pathogen: From acne to implant- infections, from phylotype to resistance. *Médecine et maladies infectieuses* 44: 241-250.

Aswani V., Tremblay D. M., Moineau S. in Shukla S. K. 2011. *Staphylococcus epidermidis* Bacteriophages from the Anterior Nares of Humans. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 77. No. 21. 7853-7855.

Babu E. in Oropello J. 2011. *Staphylococcus lugdunensis*: the coagulase-negative staphylococcus you don't want to ignore. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 10:901-907.

Brüggemann H. in Lood R. 2013. Bacteriophages infecting *Propionibacterium acnes*. Hindwai Publishing Corporation, BioMed Research International.

Chiller K., Selkin A. B. in Murakawa J. G. 2001. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Vol 6, št 3. 170-174

Clinical and Laboratory Standards Institute. <http://clsi.org/> (datum dostopa: 25.10.2015).

Conlan S., Mijares A.L., Becker J., Blakesley R.W., Bouffard G.R., Brooks S., Coleman H., Gupta J., Gurson N., Park M., Schmidt B, Thomas P.J., Otto M., Kong H.H., Murray P.R. in Segre J.A. 2012. *Staphylococcus epidermidis* pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biology* 13.

Cordain L., Lindeberg S., Hurtado M., Hill K., Eaton B in Brand- Miller J. 2002. Acne Vulgaris. A Disease of Western Civilization. *Archives of Dermatology*. 138:1584-1590.

Cogen A. L., Nizet V. in Gallo R. L. 2008. Skin microbiota: a source of disease or defence? *British Journal of Dermatology* 158(3): 442-455.

Daniel A., Bonnen P. E. in Fischetti V. 2007. First Complete Genome Sequence of Two *Staphylococcus epidermidis* Bacteriophages. *Journal of Bacteriology*. Vol 189, no5. 2086-2100.

Del Rosso Q. J. in Kim G. 2009. Optimizing Use of Oral Antibiotics in Acne Vulgaris. *Dermatologic Clinics* 1:33-42.

Dhillon K. S. in Varshney R. K. 2013. Study of Microbiological Spectrum in Acne Vulgaris: An *In vitro* Study. *Scholars Journal of Applied Medical Science* 6:724-727.

Dréno B., Bettoli V., Ochsendore F., Layton A., Mobacken H. in Degreef H. 2004. European recommendation on the use of oral antibiotic for acne. *European Journal of Dermatology* 14:391-399.

Ferrar M.D., Howson K.M., Bojar R.A., West D., Towler J.C., Parry J., Pelton K. in Holland T.K. 2007. Genome Sequence and Analysis of a *Propionibacterium acnes* Bacteriophage. *Journal of Bacteriology* 189: 4161-4167.

Fukushima M., Kakinuma K. in Kawaguchi R. 2002. Phylogenetic Analysis of *Salmonella*, *Shigella* and *Echerichia coli* Strain on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. *Journal of Clinical Microbiology*. 8: 2779-2785.

Gutiérrez D., Martínez B., Rodríguez A. in García P. 2010. Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Staphylococcus epidermidis*. *Current Microbiology*, 61, 6: 601-608.

Gutiérrez D., Martínez B., Rodríguez A. in García P. 2012. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomic* 13:228.

Grice A. E., Kong H. H., Conlan S., Deming B. C., Davis J., Young C. A., Bouffard G. G., Blakesley R. W., Murray R. P., Green D. E., Turner L. M. in Segre A. J. 2009. Topographical and Temporal Diversity of Human Skin Microbiome. *Science*. 324: 1190-1192.

Grice A. E. in Segre A. J. 2011. The skin microbiome. *Nature reviews-Microbiology* 9: 244-253

Habulin M. in Primožič M. 2008. Biokemijska tehnika. Navodila za laboratorijske vaje (zbrano gradivo). Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. Univerza v Mariboru.

Haque N., Hossain M.A., Bilkis L., Musa A. K., Mahamud C., Bari M. S., Haque N., muhammad N., Parvis U.S., Islam M.T., in Haque S. 2009. Antibiotic susceptibility pattern of *Staphylococcus epidermidis*. Mymensing Medical Journal 18(2): 142-147.

Jeršek B. 2013. Mikrobiološka analiza: navodila in delovni zvezek za laboratorijske vaje. Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo. Univerza v Ljubljani.

Kutateladze M. in Adamin R. 2010. Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics, Trends in Biotechnology 12: 591-595.

Lewin B., Krebs J. Kilpatrick T. S. in Goldstein S. E. 2011. Lewin's GENE X, poglavje 27 Phage Strategies str 767-792.

Lomholt B. H. in Kilian M. 2014. Clonality and Anatomic Distribution on the Skin of Antibiotic Resistant and Sensitive *Propionibacterium acnes*. Acta Dermato-Venereologica 94: 534-538.

Lood R., Mörgelin M., Holmberg A., Rasmussen M. in Collin M. 2008. Inducible Siphoviruses in superficial and deep tissue isolates of *Propionibacterium acnes*. BMC Microbiology 8:139

Lood R. in Colin M. 2011. Characterization and genome sequencing of two *Propionibacterium acnes* phages displaying pseudolysogeniy. BMC Genomics 12:198.

Madigan M.T. in Martinko J.M. 2006. Brock biology of microorganisms. 11 izdaja. Pearson Prentice Hall Upper Saddle River. New Jersey.

Marion D. in Stoughton R. B. 1982. Slinical use of a selective culture medium for wild and antibiotic-resistant *Propionibacterium acnes*. Journal of the American Academy of Dermatology 6:902-908.

Marinelli J.L., Fitz G.S., Hayes C., Bowman C., Inkeles M., Loncaric A., Russell D.A., Jacobs S.D., Cokus S., Pellegrini M., Kim J., Miller J.F., Hatfull G.F. in Modlin R.L. 2012. *Propionibacterium acnes* Bacteriophages Display Limited Genetic Diversity and Broad Killing Activity against Bacterial Skin Isolates. American Society for Microbiology. mBIO 3:5.

Melo L. D. R., Sillankorva S., Ackermann H-W., Kropinski M. A., Azeredo J. in Cerca N. 2014. Isolation and characterization of a new *Staphylococcus epidermidis* broad-spectrum bacteriophage. Journal of General Virology 95: 506-515.

Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen. *Nature Reviews Microbiology* 7: 555–567

Nishijima S., Kurokawa I., Katoch N. in Watanabe K. 2000. The Bacteriology of Acne Vulgaris and Antimicrobial Susceptibility of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Acne Lesions. *The Journal of Dermatology* 27:318-323.

Noyon V., Legallou F., Richet H. in Dreno B. 1998. The resistance of *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* to cyclines. The Research and Study Group on Acne. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie* 125(12):885-887

Patrick S. in McDowell A. 2009. Genus I. *Propionibacterium*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria* 1138-1155.

Pathak R., Kasama N., Kumar R. in Gautam H. K. 2013. *Staphylococcus epidermidis* in Human Skin Microbiome associated with Acne: A Cause of Disease or Defence? *Research Journal of Biotechnology* vol (8) 12 stran: 78- 82

Queck S. H. in Otto M. 2008. *Staphylococcus epidermidis* and the other Coagulase-Negative Staphylococci. *Staphylococcus: Molecular Genetics*. 227-248.

Rajiv P., Nitesh K., Raj K. in Hemant K.G. 2013. *Staphylococcus epidermidis* in Human Skin Microbiome associated with Acne: A Cause of Disease or Defence? *Research Journal of Biotechnology*. 8: 78-82

Rollason J., McDowell A., Albert B. H., Barnard E., Worthington T., Hilton C. A., Vernallis A., Patrick S., Elliott T. in Lambert P. 2013. Genotypic and Antimicrobial Characterisation of *Propionibacterium acnes* Isolation from Surgically Excised Lumbar Disc Herniations. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International*.

Ross J. I., Snelling A. M., Carnegie E., Coates P., Cunliffe W. J., Bettolo V., Tosti G., Katsambas A., Galvan Pérez Del Pulgar J. I., Rollman O., Török L., Eada E. A. in Cove J.H. Clinical and Laboratory Investigations. Antibiotic-resistant acne: lessons from Europe. *British Journal of Dermatology* 148:467-478.

Rowlinson M.C., LeBourgeois P., Ward K., Song Y., Finegold S.M. in Bruckner D.A. 2006. Isolation of a Strictly Anaerobic Strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of clinical microbiology* 44:857-860.

Ru'aa Alharithy, 2011, Adolescent's acne: Scaring inside out! Journal of the Saudi Society of Dermatology & Dermatologic Surgery. University of Toronto. Kanada. 15, 43-46

Sabour M.P in Griffiths M. W. 2010. Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogenes. American Society for Microbiology. Washington, DC.

Schleifer K.H. in Bell J.A. 2011. Family VIII. Staphylococcaceae. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Second edition. Volume three. The Firmicutes 392-420.

Sabour M.P in Griffiths M. W. 2010. Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogenes. American Society for Microbiology. Washington, DC.

Son S. J., Lee S. J., Jun S. Y., Yoon S. J., Kang S. H., Paik H. R., Kang J. O. in Choi Y.J. 2010. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. Applied Microbial Biotechnology 86: 1439-1449.

Thomsen B.M., Lomholt H.B. in Kilian M. 2008. Acne is Not Associated with Yet- Uncultured Bacteria. Journal of Clinical Microbiology 46, št 10: 3355-3360.

Wang Y., Kuo S., Shu M., Dai A., Two A., Gallo R. L. in Huanh C-M. 2014. *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of *Propionibacterium acnes*: implications of probiotics in acne vulgaris. Applied Microbiology and Biotechnology. 98(1): 411-24.

Webster F. G. in Graber M. E. 2008. Antibiotic Treatment for Acne Vulgaris. Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery 27:183-187

William H. G., 2007, Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections, International Journal of Antimicrobial Agents 30: 118-128

Woese C.R., Fox G.E., Zablen L., Unchida T., Bonen L., Pechman K., Lewin B.J., Stahl D. 1975. Conservation of primary structure in 16 S ribosomal RNA. Nature 245, 5495:83-86.

Zandi S., Vares B. in Abdollahi H. 2011. Determination of microbial agents of acne vulgaris and *Propionibacterium acnes* antibiotic resistance in patients referred to dermatology clinics in Kerman, Iran. Jundishapur Journal of Microbiology 4(1): 17-22.

Zouboulis C. C. 2004. Acne and Sebaceous Gland Function. Clinics in Dermatology 22: 360-366.

PRILOGA A: Identificirani sevi bakterij *Propionibacterium*

	KODA	VRSTA	DATUM VZORČENJA	DATUM INKUBACIJE	VZOREC	MESTO	STAROST	SPOL	POSEBNOSTI	OBLIKA KOLONIJE
PaA1	41HD78	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Vzorec aken	Obraz	28	Ž	Ne	Majhna, mlečno bela kolonija
PaA1+	41HE37	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Vzorec aken	Obraz	28	Ž	Ne	Srednja, mlečno bela kolonija
PaA2+	41HE38	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Vzorec aken	Hrbet	27	Ž	Puder	Bela kolonija
PaF3+	41HE39	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	24	Ž	Ne	Srednje velika bela kolonija
PaF3	41HD79	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	24	Ž	Ne	Zelo majhna mlečno blede svetleča kolonija
PaA4	41HE40	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Vzorec akne	Obraz	27	M	Ne	Izbočena, svetleča mlečno bela kolonija
PaA4+	41HE41	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Vzorec aken	Obraz	27	M	Ne	Mlečno bela kolonija
PaD4	41HD88	<i>Propionibacterium acnes</i>	23.03.15	03.04.15	Vzorec aken	Obraz	17	M	Klinični vzorec	Krem kolonija z grobo površino
PaB6	41HE03	<i>Propionibacterium acnes</i>	15.02.15	16.02.15	Bris kože	Hrbet	26	Ž	Pol leta brez antibiotika	Krem bele kolonije, majhne
PaF4k	41HE08	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	27	M	Ne	Srednje velika krem kolonija
PaF4r	41HE09	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	27	M	Ne	Izbočena, svetleča mlečno bela kolonija
PaS10	41HE10	<i>Propionibacterium acnes</i>	12.02.15	12.02.15	Trak za čiščenje	Nos	40	Ž	Ne	Mlečno bela kolonija
PaA3	41HE06	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	27	Ž	Ne	Srednje velika bela kolonija
PaA3+	41HE07	<i>Propionibacterium acnes</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	27	Ž	Ne	Majhna, mlečno bela kolonija
PaF1	41HD77	<i>Propionibacterium granulosum</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	28	Ž	Ne	Svetleče bela, izbočena kolonija
PaF4	41HD80	<i>Propionibacterium granulosum</i>	29.01.15	29.01.15	Bris kože	Obraz	24	Ž	Ne	Mlečno bela kolonija
PaF3r	41HE02	<i>Propionibacterium granulosum</i>	01.04.15	01.04.15	Bris kože	Obraz	24	Ž	Ne	Drobna krem kolonija
PaS2	41HD84	<i>Propionibacterium avidium</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	27	M	Ne	Manjša temno krem kolonija
PaS3	41HE00	<i>Propionibacterium avidium</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	28	Ž	Ne	Velika temno krem kolonija, izbočena
PaF1r	41HE05	<i>Propionibacterium avidium</i>	01.04.15	01.04.15	Bris kože	Obraz	28	Ž	Ne	Velika temno krem-roza kolonija


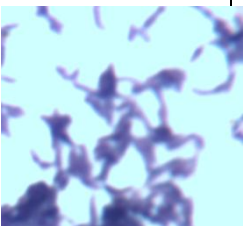
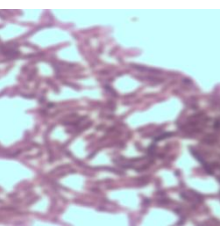
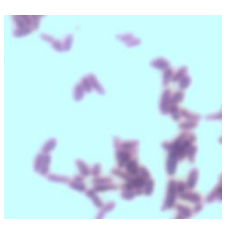
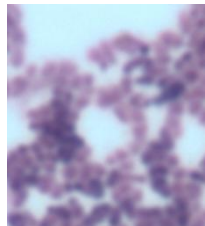
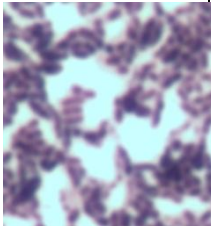
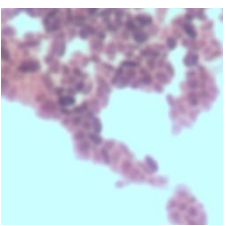

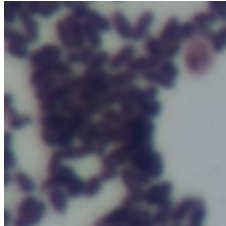
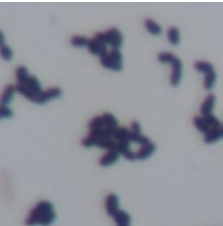
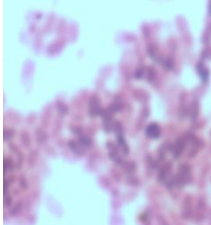

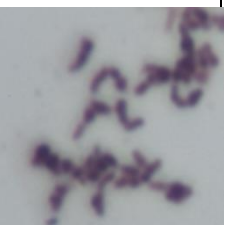
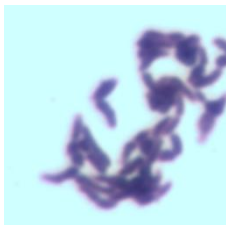

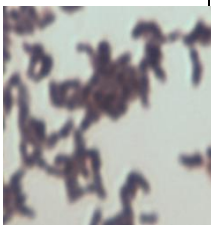
PRILOGA B: Identificirani sevi bakterij *Staphylococcus*

	KODA	VRSTA	DATUM VZORČENJA	DATUM INKUBACIJE	VZOREC	MESTO	STAROST	SPOL	POSEBNOSTI	OBLIKA KOLONIJE
SeS1	41HE25	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	45	M	Ne	Bež majhna kolonija
SeS2	41HE26	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	27	M	Ne	Bež kolonija
SeD2	41HD92	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19.03.15	3.04.15	Vzorec aken	Obraz	11	M	Sistemska terapija doksiciklin	Bela kolonija
SeF6	41HE35	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15.02.15	16.02.15	Bris kože	Obraz	26	Ž	Pol leta brez antibiotika	Krem roza kolonija
SeB5	41HE36	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15.02.15	16.02.15	Bris kože	Hrbet	14	M	Močne akne	Krem roza kolonija
SeD3	41HD93	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	23.03.15	3.03.15	Vzorec aken	Hrbet	20	M	Klinični vzorec	Krem roza kolonija
SeS3	41HE27	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	27	Ž	Ne	Krem roza kolonija
SeS4	41HE28	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	24	Ž	Ne	Krem roza kolonija
SeS5	41HE29	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	17	Ž	Puder	Krem roza kolonija
SeS6	41HE30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	18	Ž	Ne	Krem bež kolonija
SeS9	41HE33	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	40	M	Ne	Krem kolonija
SeS8	41HE32	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	28	M	Ne	Svetla krem kolonija
SeK4	41HD95	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	23.03.15	24.03.15	Vzorec aken	Obraz	60	Ž	Ne	Bež svetleča kolonija
PaK5g	41HD90	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	23.03.15	24.03.15	Vzorec aken	Obraz	33	Ž	Ne	Bež kolonija
SeK5	41HD96	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	23.03.15	24.03.15	Vzorec aken	Obraz	33	Ž	Ne	Bež kolonija
SeS7	41HE31	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	27	Ž	Ne	Bež kolonija
SeF5	41HE34	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	15.02.15	16.02.15	Bris kože	Obraz	14	M	Močne akne	Bež kolonija
PaF5	41HD81	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	15.02.15	16.02.15	Bris kože	Obraz	14	M	Močne akne	Temna krem kolonija
PaF5or	41HD82	<i>Staphylococcus aureus</i>	15.02.15	16.02.15	Bris kože	Obraz	26	Ž	Pol leta brez antibiotika	Oranžna kolonija
SeD4	41HD94	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	23.03.15	03.04.15	Vzorec aken	Obraz	17	M	Klinični vzorec	Rumeno oranžna kolonija

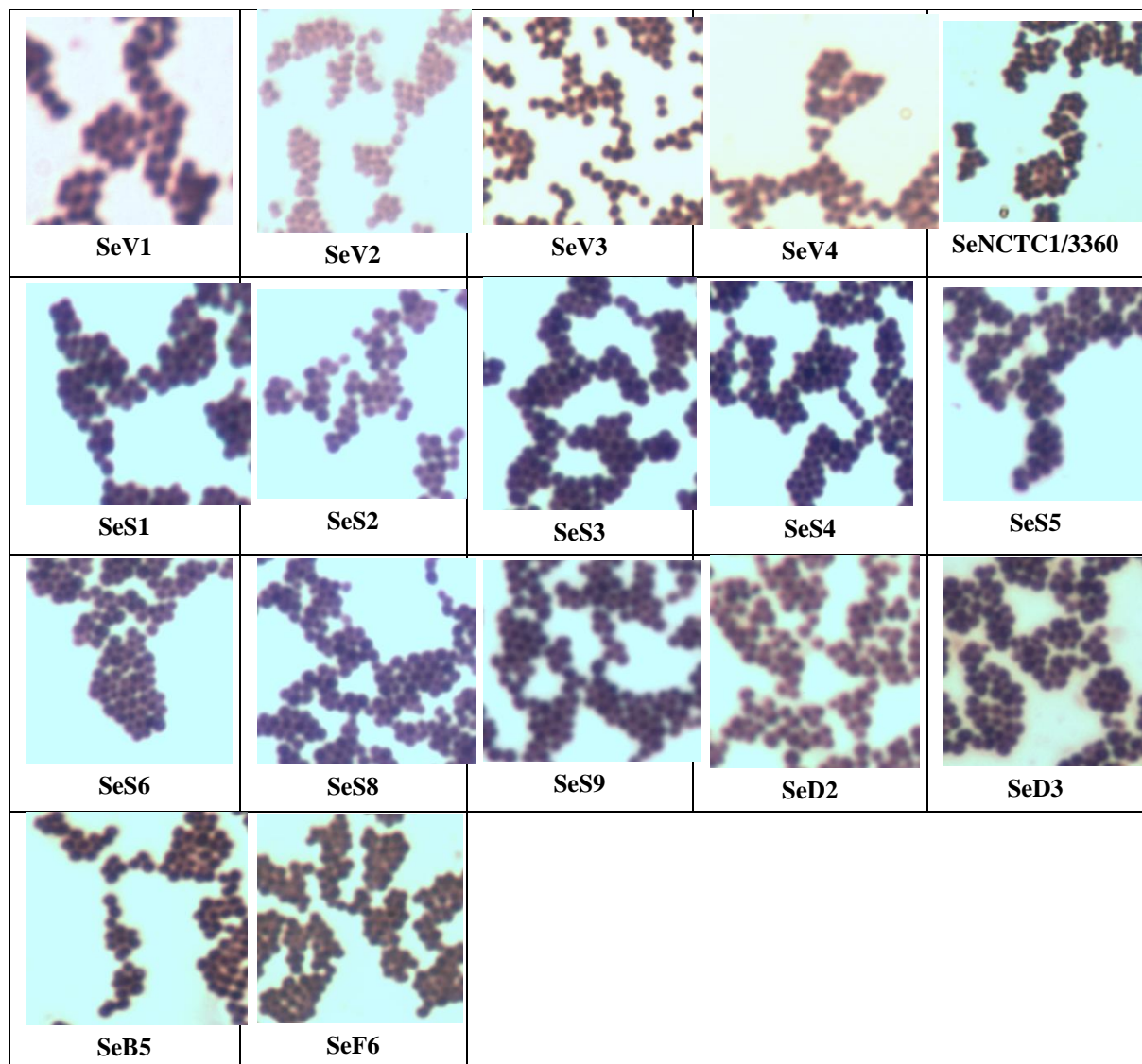
PRILOGA C: Ostali identificirani sevi

	KODA	VRSTA	DATUM VZORČENJA	DATUM INKUBACIJE	VZOREC	MESTO	STAROST	SPOL	POSEBNOSTI	OBLIKA KOLONIJE
PaK5r	41HD89	<i>Lactococcus garvieae</i>	23.03.15	24.03.15	Vzorec aken	Obraz	33	Ž	Ne	Rjava kolonija
PaK5k	41HD90	<i>Lactococcus garvieae</i>	23.03.15	24.03.15	Vzorec aken	Obraz	33	Ž	Ne	Temna krem kolonija
PaF6k	41HD83	<i>Enterococcus faecalis</i>	15.02.15	16.02.15	Bris kože	Obraz	26	Ž	Pol leta brez antibiotika	Temna krem kolonija
PaS1	41HD99	<i>Enterococcus faecalis</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos		M	Ne	Zelo drobna, svetlo krem, prozorna kolonija
PaD1	41HD86	<i>Lactobacillus gramins</i>	11.03.15	03.04.15	Vzorec aken	Obraz	18	Ž	Sistemska terapija z roaccutanom	Krem kolonija
PaS4	41HE01	<i>Lactobacillus paracasei</i>	10.02.15	10.02.15	Trak za čiščenje	Nos	24	M	Ne	Bele prozorne in ploščate kolonije
PaD3	41HD87	<i>Streptococcus oralis</i>	23.03.15	03.04.15	Vzorec aken	Hrbet	20	M	Klinični vzorec	Krem kolonija z nazobčanim robom
PaE1	41HE04	<i>Streptococcus salviarius</i>	26.03.15	27.03.15	Bris ognjka	Oči	32	Ž	Antibiotik za zdravljenje oči ciprofloksacin in tobramicin	Temno krem kolonija

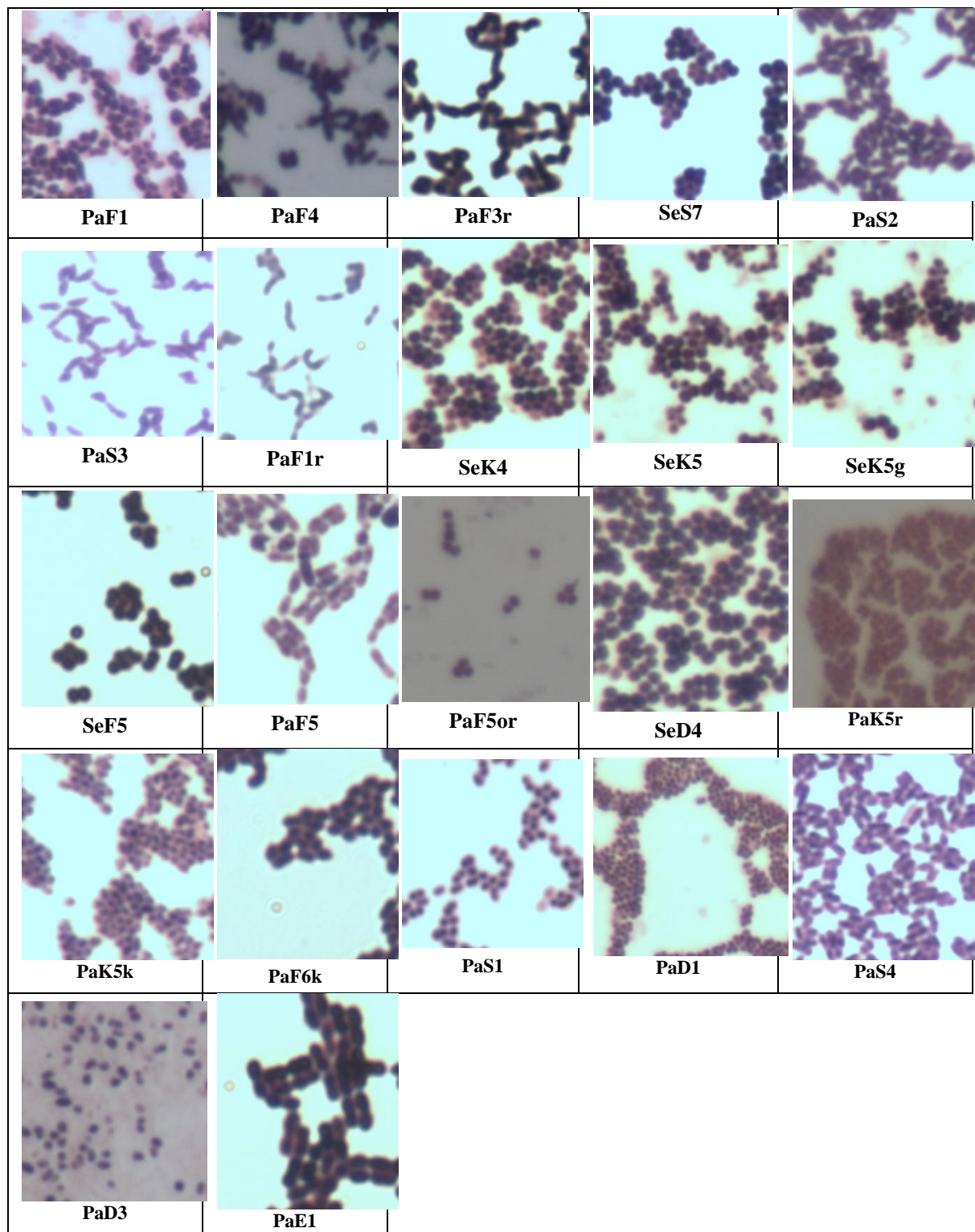
PRILOGA D: Fotografije identificiranih sevov *P. acnes* oz. preparatov z metodo barvanja po Gramu

 Pa2c/430	 PaNCTC/737	 PaA1+	 PaA2+	 PaF3
 PaF3+	 PaA3	 PaA3+	 PaM4	 PaM4+
 PaA1	 PaB6	 PaD4	 PaS10	 PaF4r
 PaF4k				

PRILOGA E: Fotografije identificiranih sevov *S. epidermidis* oz. preparatov z metodo barvanja po Gramu



PRILOGA F: Fotografije identificiranih sevov ostalih bakterij oz. preparatov z metodo barvanja po Gramu



PRILOGA G: Vrednosti merjenj OD₆₀₀ in logaritmiranih vrednosti koncentracije CFU/ml za izoliran sev in klinični sev.

Sev \ Čas (h)	0	24	48	72
OD_2c/430	0,004	0,025	0,117	0,169
OD_NCTC 737	0,002	0,041	0,188	0,217
Log N (CFU_2c/430)	5,34830486	7,15228834	8,17897695	8,693726949
Log N (CFU_NCTC 737)	4,9459607	7,6294096	8,55870857	8,71432976

a) Izoliran (2c/430) in tipski (NCTC/737) sev *P. acnes*

Sev \ Čas (h)	0	4	8	25	29	33
OD SeV1	0,031	0,136	0,257	1,303	1,311	1,311
OD SeNCTC13360	0,043	0,157	0,295	1,436	1,439	1,438
Log N (CFU SeV1)	6,87938263	7,94385542	8,77195479	9,75204844	9,74546516	9,71642073
LogN (CFU Se NCTC/13360)	7,29003461	8,54032947	8,84726410	9,85853719	9,80002935	9,87302981

b) Izoliran (SeV1) in tipski (NCTC/13360) sev *S. epidermidis*

PRILOGA H: Določevanje titra

Bakteriofag	Redčitev	Število plakov	Povprečni titer paralelk	Povprečni titer	Bakteriofag	Redčitev	Število plakov	Povprečni titer paralelk	Povprečni titer
S1	-4	161	1,57E+07	1,57E+07	S2	-4	NC	NC	1,89E+08
	-4	153				-4	NC		
	-5	16	1,95E+07			-5	191	1,89E+08	
	-5	23				-5	187		
S3	-4	NC	NC	7,05E+07	S4	-4	99	1,04E+07	1,70E+07
	-4	289				-4	109		
	-5	87	7,05E+07			-5	17	2,35E+07	
	-5	54				-5	30		
S5	-4	32	2,70E+06	4,35E+06	S6	-4	NC	NC	2,81E+08
	-4	54				-4	NC		
	-5	1	6,00E+06			-5	279	2,81E+08	
	-5	11				-5	283		
S7	-4	209	2,12E+07	2,98E+07	S8	-4	298	NC	5,40E+07
	-4	214				-4	NC		
	-5	32	3,85E+07			-5	45	5,40E+07	
	-5	45				-5	63		
S9	-4	NC	NC	8,05E+07	D2	-4	124	1,39E+07	1,84E+07
	-4	NC				-4	153		
	-5	77	8,05E+07			-5	15	2,30E+07	
	-5	84				-5	31		
D5	-4	NC	NC	7,85E+07	K1	-4	281	NC	2,70E+07
	-4	NC				-4	NC		
	-5	81	7,85E+07			-5	16	2,70E+07	
	-5	76				-5	38		
K2	-4	NC	NC	6,20E+07	K3	-4	NC	NC	2,32E+08
	-4	NC				-4	NC		
	-5	53	6,20E+07			-5	229	2,32E+08	
	-5	71				-5	234		
K4	-4	NC	NC	7,65E+07	K5	-4	132	1,45E+07	2,35E+07
	-4	NC				-4	158		
	-5	75	7,65E+07			-5	28	3,25E+07	
	-5	78				-5	37		
A1	-4	66	7,05E+06	6,78E+06	A2	-4	22	2,50E+06	3,00E+06
	-4	75				-4	28		
	-5	5	6,50E+06			-5	2	3,50E+06	
	-5	8				-5	5		
A3m	-4	221	2,13E+07	2,19E+07	A3j	-4	230	NC	3,40E+07
	-4	204				-4	NC		
	-5	22	2,25E+07			-5	30	3,40E+07	
	-5	23				-5	38		
F5	-4	NC	NC	2,93E+08	F6	-4	NC	NC	2,85E+08
	-4	NC				-4	NC		
	-5	289	2,93E+08			-5	253	2,85E+08	
	-5	297				-5	247		
E1	-4	NC	NC	2,85E+08					
	-4	NC							
	-5	296	2,85E+08						
	-5	273							

Bakteriofag	Redčitev	Število plakov	Povprečni titer paralelk	Povprečni titer
S3	-4	NC	NC	2,89E+08
	-4	NC		
	-5	NC	2,89E+08	
	-5	289		